

11219  
+  
2ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
División de Estudios de Postgrado  
Instituto Nacional de la Nutrición  
"SALVADOR ZUBIRAN"

HEPATITIS GRANULOMATOSA: Diagnóstico de  
*Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR

## TESIS DE POSTGRADO

Que para obtener el Título de  
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA  
p r e s e n t a

*María Lilia Díaz Betancourt*

### TUTORES

Dr. Guillermo Ruiz-Palacios  
Dr. Eduardo Sada Díaz  
Dra. Yolanda López Vidal

### COTUTORES

QFB. María Teresa Herrera  
Dr. Rogelio Hernández P.  
Dr. Juan Calva M.

México, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

<b>0. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. JUSTIFICACION</b> .....	<b>3</b>
<b>2. HIPOTESIS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>6</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	<b>6</b>
<b>5. MARCO TEORICO</b> .....	<b>7</b>
<b>5.1. HEPATITIS GRANULOMATOSA</b> .....	<b>7</b>
5.1.1. Patología .....	7
5.1.2. Patogénesis .....	8
5.1.3. Etiología .....	8
5.1.3.1. Infecciosa .....	9
5.1.3.2. Causas no infecciosas .....	9
5.1.4. Hepatitis granulomatosa por micobacterias .....	10
<b>5.2. APLICACION DE LA BIOLOGIA MOLECULAR EN EL         DIAGNOSTICO DE INFECCION TUBERCULOSA</b> .....	<b>12</b>
<b>5.3. METODOS DE EXTRACCION DE ADN DE BACTERIAS</b> .....	<b>18</b>
<b>5.4. METODOS DE PURIFICACION DE ADN DE MUESTRAS         EMBEBIDAS EN PARAFINA</b> .....	<b>21</b>
<b>5.5. METODOS DE AMPLIFICACION DE ADN</b> .....	<b>22</b>
<b>5.6. IDENTIFICACION DE LA ESPECIFICIDAD DE UN FRAGMENTO DE         ADN</b> .....	<b>23</b>
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b>	

<b>7.3. ESTANDARIZACION DE LA EXTRACCION Y AMPLIFICACION DEL ADN DE LAS BIOPSIAS</b> .....	40
<b>7.4. ESTUDIO CONTROLADO Y CIEGO</b> .....	42
<b>7.5. HEPATITIS GRANULOMATOSA</b> .....	43
<b>8. DISCUSION</b> .....	48
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> .....	56
<b>10. ANEXO</b> .....	69

## 0. INTRODUCCION

La frecuencia de la hepatitis granulomatosa (HG) es de 3 a 14% en biopsias hepáticas realizadas en los hospitales generales (1,2,3), misma que depende de la prevalencia de enfermedades asociadas con granulomatosis.

El diagnóstico del padecimiento de un paciente en el cual se detectan granulomas en el hígado, implica la búsqueda de numerosas enfermedades que se han asociado a este problema, desde las infecciosas, siendo la más frecuente la tuberculosis (TB), hasta las neoplásicas como la enfermedad de Hodgkin y los linfomas. Otras enfermedades como la sarcoidosis, las primarias del hígado, las del colágeno y el uso de ciertos medicamentos (2,3,4,5,6,7).

Tradicionalmente la biopsia hepática ha aportado en forma limitada al diagnóstico etiológico de la HG (8,9), en el 36% de los casos la forma de presentación es fiebre de origen desconocido (2,6,7) siendo necesarios exámenes serológicos, tinciones, cultivos, exámenes radiológicos y procedimientos invasivos como las laparotomías. Después de estos procedimientos el porcentaje de HG con etiología idiopática es del 6.5 al 36% (2,7,10,11,12).

En el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" ("INNSZ") el diagnóstico de TB se basa en el cuadro clínico y epidemiológico, el PPD, la tinción, el cultivo para micobacterias y la respuesta al tratamiento empírico. En un estudio sobre la utilidad de la biopsia hepática para el diagnóstico de la fiebre de origen desconocido entre 1987 y 1990 se encontró que de 14 casos diagnosticados finalmente como TB, 13 tenían hallazgos histológicos de TB y la tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes fué positiva en solo 3 y en ninguna se aisló el bacilo del cultivo. También el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) ha sido nulo en las biopsias hepáticas procesadas para cultivo durante los años 1983 a 1992.

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) surge como una alternativa de diagnóstico rápido y efectivo de la TB. La experiencia en cultivos, y algunas muestras de líquidos y tejidos mediante PCR, utilizando diversos iniciadores para amplificar fragmentos de los genes que codifican para la proteínas 65 Kda (gene *Gro EL*), compartido por micobacterias típicas y atípicas, la proteína MPB 64 y el antígeno b del complejo *M. tb*, así como algunas secuencias de inserción ha sido descrita.

Los pacientes atendidos en el "INNSZ" son generalmente inmunosuprimidos ya sea con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, pacientes transplantados, oncológicos, con enfermedades reumáticas y presentan un alto riesgo para padecer HG predominantemente de origen infeccioso causada por *M. tb*.

En el Departamento de Infectología la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), ha sido utilizada para la detección de ADN del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), *V. cholera*, *H. pylori* y *E. histolytica*. Con esta experiencia, en el presente estudio se plantea la aplicación del PCR en el diagnóstico rápido de *M. tb* como agente causal de la HG, utilizando tejido de biopsias previamente fijadas en formalina y embebidas en parafina.

## 1. JUSTIFICACION

La frecuencia con la que se presenta la HG es de 2.4 a 14% en biopsias hepáticas realizadas en hospitales generales (1,2,3,7,9).

Entre el 10% y el 53% de las HG en la población general están ocasionadas por *M. tb* (2,4,7) y en el huésped inmunocomprometido esta proporción probablemente sea mayor.

El bacilo *M. tb* puede estar implicado en la etiología de la HG cuando en los granulomas se observa la presencia de necrosis caseosa, misma que se presenta con una frecuencia que va de un 0 a 100%. Existen otros agentes infecciosos y enfermedades no infecciosas que también pueden producirla como son: hongos, *Brucella* spp, *C. burnetti*, *T. pallidum* y la granulomatosis de Wegener (2,4,7,9,11, 13,14,15).

Los métodos de diagnóstico de TB actuales presentan limitaciones importantes. La prueba con derivado proteínico purificado de *M. tb* (PPD) es una prueba pobremente estandarizada, puede cruzar inmunológicamente con micobacterias atípicas y es una prueba usualmente falsa negativa en pacientes inmunosuprimidos, desnutridos y con infecciones virales. La tinción para bacilos ácido alcohol resistentes es positiva entre el 0 a 35% de los casos (2,4,10,13,14,15) y el cultivo es positivo entre 0 a 10% de los casos (2,7).

Todas estas limitaciones de diagnóstico etiológico de la HG aunado a la alta prevalencia de la TB como causa de la misma, han llevado a establecer como medida de tratamiento de la entidad la administración de medicamentos antituberculosos en forma empírica (2,16,17,18), lo que causa algunas veces pérdida de tiempo en el diagnóstico del paciente, una exposición innecesaria a la toxicidad de los antituberculosos y la elevación de los costos de la atención médica.

La aplicación de procedimientos de la biología molecular al diagnóstico temprano de la

infección tuberculosa ha producido como resultados la utilización de sondas de ADN completo, fragmentos de ADN, cADN y rARN para la identificación de micobacterias del complejo *M. tb*, *M. avium-intracellulare* y *M. gordonae* en cultivos. En combinación con el sistema radiométrico el diagnóstico puede tenerse a la primera semana de crecimiento visible, sin embargo su utilidad en la detección de micobacterias en forma directa sobre muestras clínicas es limitada por el escaso número de ellas que con frecuencia se encuentran en líquidos y tejidos (19,21,22).

Con la introducción del PCR es posible amplificar el ADN extraído de 1 a 2 micobacterias (23), detectarlo fácilmente e identificarlo específicamente.

Los métodos de extracción de ADN en tejidos previamente fijados en formaldehído y embebidos en parafina para su utilización en la identificación de otros agentes infecciosos por PCR, han sido descritos y utilizados por Goelz, Impraim, Shibata y Manos (24,25,26,27,28).

La magnitud del problema de la TB en los países en desarrollo como México y especialmente en los pacientes con las características mencionadas en el Instituto, hace necesaria la implementación de métodos de diagnóstico rápido y específico de la tuberculosis.

## **2. HIPOTESIS**

Una de las principales causas de la HG son las micobacterias del complejo *M. tb*, misma que será diagnosticada por PCR en biopsias hepáticas previamente fijadas en formaldehído y embebidas en parafina.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar y validar la prueba de PCR en el diagnóstico de infección por *M. tb* como causa de HG, utilizando como iniciadores 5'CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG Y 5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG, para amplificar un fragmento de 123 pb perteneciente a la secuencia de inserción IS6110 del genoma de micobacterias del complejo *M. tb*.

### 4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 4.1. Determinar la sensibilidad y especificidad de los iniciadores para detectar *M. tb* mediante ensayos en cultivos de cepas conocidas de *M. tb*, micobacterias no TB, otros microorganismos no micobacterianos y ADN humano.
- 4.2. Estandarizar la extracción de ADN a partir de biopsias fijadas con formalina y embebidas en parafina.
- 4.3. Determinar la sensibilidad y especificidad del PCR para identificar biopsias con cultivo positivo a *M. tb*.
- 4.4. Determinar la sensibilidad y especificidad de la reacción de PCR para detectar HG de etiología tuberculosa.

## 5. MARCO TEORICO

La TB continúa siendo uno de los mayores problemas de salud, particularmente en los países en desarrollo donde se estima que cada año entre 6 y 8 millones de personas desarrollan TB y al menos 2 a 3 millones mueren por esta enfermedad. En estos países las nuevas tecnologías aplicadas en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad no han tenido el impacto esperado en su control (29).

Entre las formas de presentación de la TB están: la HG aislada, la asociada a fiebre de origen desconocido, a enfermedad pulmonar primaria o de reactivación y a una enfermedad generalizada.

### 5.1. HEPATITIS GRANULOMATOSA

La HG se refiere a la presencia de granulomas en el tejido hepático, minoritariamente asociada a inflamación verdadera o disfunción hepatocelular, de allí que el término hepatitis sea inadecuado (30).

La HG se asocia con una amplia variedad de enfermedades infecciosas, neoplásicas, alérgicas, inmunológicas, del colágeno, metabólicas, medicamentosos y tóxicos. La HG idiopática constituye el 6.5 al 36% de los casos (2,3,4,5,6,7,10,11).

#### 5.1.1. Patología

El hígado se encuentra frecuentemente infiltrado por nódulos discretos bien definidos de 0.5 a 2 mm de diámetro, que consisten en agregados de células epiteloides o macrófagos, rodeados por un anillo de células mononucleares predominantemente linfocitos, algunas veces con necrosis caseosa central y células gigantes multinucleadas. La arquitectura lobular del hígado generalmente se encuentra conservada, aunque

ocasionalmente se puede hallar infiltrado inflamatorio escaso, áreas de fibrosis y curación por hialinización y encapsulación (31,32).

### 5.1.2. Patogénesis

En los modelos animales se ha demostrado que un mecanismo inmunológico mediado por células está involucrado en la formación del granuloma. La utilización de huevecillos de *S. mansoni* mostró que para la formación del granuloma se requiere del estímulo antigénico persistente y una reactividad anamnésica incrementada que lleva a la formación de la lesión de manera más rápida y aumentada (32,34).

Para explicar las enfermedades granulomatosas de hipersensibilidad, se han postulado otros mecanismos como: la activación del complemento desencadenada por complejos antígeno-anticuerpo solubles y la liberación por parte de los macrófagos de los factores quimiotácticos. En los granulomas no inmunológicos la liberación inespecífica de mediadores de la inflamación a partir de los macrófagos activados por la fagocitosis del antígeno (32,35,36,37,38). Los monocitos y macrófagos migran al área de inflamación o reacción inmunológica y se transforman en células epiteloideas, debido probablemente a la persistencia del antígeno dentro de los macrófagos, como ejemplo, en la infección por micobacterias, la persistencia de los lípidos del bacilo dentro de los macrófagos del granuloma inducen su transformación en células epiteloideas (34, 39).

### 5.1.3. Etiología

La frecuencia de las diversas causas de HG depende de la prevalencia de enfermedades infecciosas en determinada área, el tipo de pacientes atendidos en el hospital donde se realiza el estudio, los criterios y la disponibilidad de recursos para determinar la etiología. En las diferentes series la sarcoidosis y la TB son las patologías más frecuentemente encontradas, de 10 a 46% para la sarcoidosis y de 10 a 53% para la TB (2,4,5,6,7,10,11).

5.1.3.1. **Infecciosa.** (2,4,5,6,7,10) Entre los agentes infecciosos el más frecuentemente relacionado con HG es *M. tb*, otras Bacterias asociadas son: las micobacterias atípicas, *M. leprae*, el bacilo de Calmette Guérin, *Brucella* spp, *F. tularensis*, *S. typhi*, *S. paratyphi B*, *L. monocitogenes*, *C. granulomatis*, *Nocardia* spp, *P. pseudomallei* y *T. pallidum*.

Entre los hongos están el *H. capsulatum*, *Cryptococcus* spp, *C. inimitis*, *B. dermatitidis*, *Candida* spp y *Aspergillus* spp.

Infecciones por parásitos: *S. mansoni*, *Toxocara* spp, *Ancylostoma* spp, *F. hepática*, *C. hepática*, *S. estercoralis*, *A. lumbricoides*, *E. histolytica*, *T. gondi* y *Plasmodium* spp.

Infecciones por virus, clamidias y rickettsias: citomegalovirus, virus Epstein-Barr, virus de la hepatitis y virus de la influenza B, *C. burnetti*, *C. psittaci*, *C. trachomatis* y *R. conorii*.

Otra enfermedad infecciosa con germen aun no identificado y asociada con HG es la enfermedad de Whipple.

5.1.3.2. **Causas no infecciosas** (2,3,4,5,6,7,10,11) La más frecuente es la sarcoidosis, la que en algunas series ocupa el primer lugar.

Otras son las enfermedades hepáticas primarias: La cirrosis biliar primaria, de Lanec y postnecrótica, obstrucción biliar, pericolangitis aguda y crónica, esteatosis hepática, hepatitis tóxica o por medicamentos y la crónica activa.

Neoplasias: Linfomas, cáncer del tubo digestivo y otros.

Reacciones de hipersensibilidad: Eritema nodoso, beriliosis e hipersensibilidad a medicamentos como sulfonamidas, penicilinas, alopurinol, halotano, procaína, quinidina, fenitoina y otros.

Enfermedades del colágeno: granulomatosis de Wegener, arteritis temporal, polimialgia reumática y granulomatosis alérgica.

Inmunodeficiencias: enfermedad granulomatosa crónica de la infancia e hipogamaglobulinemias.

Enfermedades Varias: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, granuloma eosinofílico del pulmón, granulomatosis linfomatoidea, enfermedad celíaca, "puente" potts-ileal, granuloma del peritoneo por talco y cuerpos extraños.

#### **5.1.4. Hepatitis granulomatosa por micobacterias**

La TB ocupa el primero o segundo lugar entre las causas infecciosas de HG y en algunos informes entre todas las causas alternándose con la sarcoidosis (2,4,5,6,10,11).

La HG puede presentarse con varias formas de TB, se sugiere que la TB pulmonar primaria se asocia a un compromiso hepático frecuente, la mayoría de las veces asintomático.

En la TB pulmonar crónica o de reactivación se han encontrado granulomas hepáticos con una frecuencia de 0 a 93% en biopsias y de 50 a 100% en autopsias (10,13,15).

En la TB generalizada se informó una frecuencia de granulomas hepáticos del 97% en un estudio de 100 autopsias (14).

La TB hepática primaria probablemente es debida a reactivación en el hígado de focos de micobacterias ocurridos durante la infección primaria y que han permanecido latentes. Esta forma se asocia a compromiso extenso del hígado (40). Otras formas poco comunes de presentación son el tuberculoma hepático y la colangitis tuberculosa (41).

El diagnóstico diferencial más difícil de la TB basado en la apariencia de los granulomas es con la sarcoidosis. Las características histopatológicas que sugieren etiología tuberculosa son: la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, la necrosis caseosa y la ausencia de reticulina, contornos irregulares e infiltrado denso de linfocitos alrededor, mientras que los hallazgos que sugieren sarcoidosis son: ausencia de necrosis caseosa, localización en los espacios porta, presencia de muchas células de Langerhans y granulomas abundantes (2,9,13,15). Sin embargo estos datos histopatológicos contribuyen poco al diagnóstico etiológico debido a que la presencia de necrosis caseosa es muy variable entre el 0 y el 100%, además puede presentarse también en las micosis, la sífilis, la brucelosis, la fiebre Q y la granulomatosis de Wegener, los bacilos ácido-alcohol resistentes se visualizan únicamente en el 0 a 35% de los casos y el cultivo es positivo entre el 0 a 10% (2,13,15).

El PPD se ha encontrado positivo en el 45% de los pacientes con TB, en el 42% de los granulomas idiopáticos y en el 13% de los pacientes con sarcoidosis (2,7).

Los hallazgos clínicos que sugieren TB especialmente si se encuentran en combinación son: fiebre de origen desconocido especialmente asociada a escalofrío, anemia, compromiso meningeo, pérdida de peso, astenia, duración de los síntomas por un período menor a 6 meses (2).

El 60% de las fiebres de origen desconocido son de etiología infecciosa, la asociación del síndrome de fiebre de origen desconocido con la HG es del 36% (2, 6 y 7) y el microorganismo aislado con más frecuencia es *M. tb*. Ante la carencia de exámenes sensibles y específicos para el diagnóstico de esta infección muchos de los granulomas

idiopáticos podrían ser de origen tuberculoso, por lo que se ha sugerido el tratamiento empírico con dos medicamentos antituberculosas durante 6 a 12 semanas y en caso de ausencia de respuesta cambiar a corticosteroides con isoniazida si el PPD es positivo (2,16,17,18,41,42).

## 5.2. APLICACION DE LA BIOLOGIA MOLECULAR EN EL DIAGNOSTICO DE INFECCION TUBERCULOSA

Recientemente se ha aplicado la biología molecular al entendimiento y el diagnóstico de las infecciones micobacterianas, habiéndose extraído su ADN y secuenciado algunos fragmentos de diferentes especies, entre ellas: *M. tb*, *M. leprae*, *M. bovis* y *M. avium-intracellulare*.

*M. tb* tiene un genoma de tamaño similar al de *E. coli*,  $2.5 \times 10^8$  Mba. Su ADN se ha clonado y se ha logrado la expresión de genes en *E. coli*, especialmente los que codifican proteínas inmunologicamente activas. Se han secuenciado genes que codifican para algunas de ellas y también proteínas de otras micobacterias así: gene *Gro EL* de *M. tb*, *M. bovis BCG*, *M. avium*, *M. paratuberculosis* y *M. fortuitum* (43,44) el gene de la proteína 36 Kda de *M. leprae* (45), el gene *pab* de la proteína de 38 Kda de *M. tb* (46), el gene de la proteína *mtp40* específica de *M. tb* (47), secuencias de inserción como IS6110 del complejo *M. tb* (48), y fragmentos de algunas clonas de *M. tb* entre ellos un fragmento de 158 pb de la clona lambda PH7311 (49), un fragmento de 123 pb de la clona M13KE39 (50) y un fragmento de rRNA 16s de *M. leprae* (51).

La secuencia de la proteína de 65 Kda consta de 540 aminoácidos, es común a muchas micobacterias, se postula sea un antígeno de la pared celular (CWP-a) y ha sido la más estudiada en *M. leprae*. El antígeno 65 KDa contiene epítopes que son comunes a varias especies de micobacterias y epítopes específicos de una especie; Ac y células T

reactivas contra este Ag, pueden encontrarse en pacientes con TB, pacientes con lepra y vacunados con BCG. El mapa deducido de la restricción enzimática del Ag 65 KDa concuerda con el publicado para el mismo Ag de *M. bovis* excepto por la presencia de dos sitios adicionales SmaI en el gene de *M. tb* y no concuerda con el del Ag 65 KDa de *M. leprae* lo que es esperado ya que en estudios de homología de ADN de micobacterias, *M. tb* tiene homología de al menos 90% con *M. bovis* y alrededor de 20 a 30% con *M. leprae*. (43,44,52,54,55,56,57,58,59,60,61,62).

El gene *Gro EL* ha sido el más utilizado para experiencias de PCR con el fin de identificar micobacterias tanto en cultivos como en muestras clínicas, tiene considerable similitud entre las diferentes micobacterias TB y no TB, su secuencia es idéntica entre *M. tb* y *M. bovis* y entre *M. avium* y *M. paratuberculosis*, sin embargo ha sido posible identificar pequeñas diferencias que se han utilizado en la elaboración de sondas específicas de *M. tb/bovis* y *M. avium/paratuberculosis*. Estas sondas se han usado para la identificación de micobacterias procedentes de cultivos y muestras clínicas especialmente líquidos (44,64,65,66,67,68) (Tabla 1a).

Fragmentos de los genes que codifican para las proteínas MPB64 y MPB70 han sido probados mediante PCR en cultivos y muestras clínicas determinándose que son específicas del complejo *M. tb* (69,70,71,72) (Tablas 1a y 1b).

Un fragmento de 158 pb perteneciente a una secuencia de inserción obtenida de la clona recombinante lambda PH7311 fué ensayado en una prueba de PCR siendo capaz de detectar hasta 20 células micobacterianas procedentes de cultivos y  $10^3$  en muestras de expectoración. Este fragmento es específico del complejo *M. tb* (49).

De la clona Mbol de 5.5 Kda específica del complejo *M. tb* se amplificó un fragmento de 336 pb en cultivos y muestras clínicas obteniendo una sensibilidad del 100% en relación con el cultivo (73).

**Tabla 1a. Experiencia en la identificación de micobacterias mediante PCR**

GENE/MICOBACTERIA	INICIADORES	PRODUCTO	AUTOR/ARO
De la prot. 65Kda de M.tb y M. no TB	TB1 5'GAGATCGAGCTGGAAGATCC TB2 5'AGCTGCAGCCCAAAGGTGT	383 pb	Hence et al. 1989 (44)
De la prot. 65Kda de M.tb y M. no TB	TB1 5'GAGATCGAGCTGGAAGATCC TB2 5'AGCTGCAGCCCAAAGGTGT	383 pb	Brisson-Noel et al. 1989 (63)
De la prot. 65Kda de M.tb y M. no TB	5'CATTGGGAAGTGTATTCCTCCGGAT 5'CTAGGTCGGGACGGTGAAGCCAGG	185 pb	Pan et al. 1990 (64)
De la prot. 65Kda de M.tb y M. no TB y la IS6110 del Comp. M.tb	TB1 5'GAGATCGAGCTGGAAGATCC TB2 5'AGCTGCAGCCCAAAGGTGT 18TB2 e 18TB7	383 pb y 325 pb	Brisson-Noel et al. 1991 (66)
De la prot. 65Kda de M.tb y M. no TB y la IS6110 del Comp. M.tb	TB1 5'GAGATCGAGCTGGAAGATCC TB2 5'GCGGATCTTGTGACGACCAAGG Bx1 5'CTGCGGGTCCCTCCACGA Bx2 5'TTGGACCCGGCGGACGTCCG	627 pb y 378 pb	Baboor et al. 1992 (68)
De la prot. 65Kda de M.tb y M. no TB y la IS6110 del Comp. M.tb	TB1 5'GAGATCGAGCTGGAAGATCC TB2 5'AGCTGCAGCCCAAAGGTGT TB28 5'CCATCGATCCGAGACCCCTGC TCAAAGGC TB29C 5'TGCTGAGACTCCTCGACGG TGATGACG	383 pb y 156 pb	Pierre et al. 1991 (67)
De la prot. 65Kda de M.tb y M. no TB y la IS6110 del Comp. M.TB	TB1 5'GAGATCGAGCTGGAAGATCC TB2 5'AGCTGCAGCCCAAAGGTGT 18TB2 e 18TB7	383 pb y 325 pb	Thierry et al. 1990 (65)
De la prot. 65Kda del Comp. M.tb (gene Pab)	MT1 5'ACCACCGAGCGGTTCCGCTGA MT2 5'GATCTGCGGCTCATCCAGGT	419 pb	Njobring et al. 1990 (69)
De la prot. MP84 del Comp. M.tb	5'TCCGCTGCCAGTCTGTCTCC 5'GTCTCTCCGAGTCTAGCCCA	240 pb	Bhanker et al. 1990 (60)
De la prot. MP84 del Comp. M.tb	5'TCCGCTGCCAGTCTGTCTCC 5'GTCTCTCCGAGTCTAGCCCA	240 pb	Bhanker et al. 1991 (70)
De la prot. MP84 del Comp. M.tb	5'TCCGCTGCCAGTCTGTCTCC 5'GTCTCTCCGAGTCTAGCCCA	240 pb	Manjunath et al. 1991 (71)
De la clona de 8.5 Kpb Mbol	5'GCGGCTCGGCGCGCTCGGTGCTT 5'GCCAACCAGCCACCCGCCGATA	338 pb	De Wit et al. 1990 (73)
SI de LAMBDA PH 7311 Prot. 126 Kda del Comp. M.tb	5'GGTCTGACGGTAATGGGT 5'CGCCATCCACATCCGCCC	158 pb	Hermans et al. 1990 (48)

**Tabla 1b. Experiencia en la identificación de micobacterias mediante PCR**

<b>GENE/MICOBACTERIA</b>	<b>INICIADORES</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>AUTOR/AÑO</b>
IS6110 del Comp. M.tb	5'CCTGCGAGCGTAGGGCTCGG 5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123 pb	Eisenach et al. 1990 (50)
IS6110 del Comp. M.tb	5'CCTGCGAGCGTAGGGCTCGG 5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123 pb	Eisenach et al 1991 (76)
IS6110 del Comp. M.tb 	ISL1 5'CGCCGCGAGCTGCGCGAT GGCGA ISL2 5'GGTGCTGGTGGTCCGAAG CGGCG	263 pb	Savic et al. 1992 (77)
De la prot. mtp40 de M.tb	PT1 5'CAACGCGCCGTCGGTGG PT2 5'CCGCCACGGCACCGC	398 pb	Del Portillo et al. 1991(23)
De la prot. MPB70 del Comp. M.tb	TB1A 5'GAACAATCCGGAGTTGACAA TB1B 5'AGCACGCTGTCAATCATGTA	372 pb	Couains et al. 1992 (72)

En 1992 el gene para la proteina mtp40 especifica de *M. tb* fue secuenciado y un fragmento de 396 pb utilizado mediante PCR en la identificaci3n de *M. tb* en cultivos y muestras cl3nicas (23) (Tabla 1b).

Las secuencias de inserci3n son elementos gen3ticos m3viles que se han encontrado en la mayoria de los microorganismos, se insertan en el genoma de las bacterias en alg3n momento de su evoluci3n y tienen utilidad en taxonomia, diagn3stico y epidemiologia. En las micobacterias se ha aislado la IS900 de *M. paratuberculosis* y la IS 6100 de *M. fortuitum* (48,74).

Del genoma de *M. tb* fue aislada y secuenciada la IS6110, consta de 1361 nt, presenta en sus extremos una secuencia de 28 pb repetida en forma invertida con 3 pb discordantes y 3 pb repetidas en forma directa (figura 1). Esta secuencia mostr3 homologia con una secuencia de inserci3n de *E. coli* al estudiarla en el banco de datos EMBL (48).

Por estudios de fragmentos de restricci3n e hibridaci3n con el ADN de *M. tb* se observ3 que el fragmento IS6110 es caracteristico de micobacterias del complejo *M. tb* (*M. tb*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*) y no se ha encontrado en *M. avium* o en *M. intracellulare* (50,75).

Entre las diferentes especies del complejo *M. tb* existen diferencias en el n3mero de copias del fragmento y su localizaci3n en el genoma, se ha estimado que *M. tb* y *M. microti* poseen entre 10 y 20 copias de dicha secuencia, mientras que *M. bovis* y *M. bovis BCG* una sola copia (65).

La determinaci3n de la posici3n del fragmento puede ser 3til en la identificaci3n de cepas de micobacterias, este hallazgo tiene su principal aplicaci3n en epidemiologia porque permite la diferenciacion entre cepas de una misma especie (75).

Los experimentos de PCR con los iniciadores Bx1 y Bx2 para amplificar un fragmento de 376 pb de IS6110 han mostrado amplificación positiva hasta con cantidades de ADN de micobacterias del complejo *M. tb* de 1 fg equivalente a 1 genoma de micobacteria, cuando el producto se detecta mediante hibridación con una sonda marcada radioactivamente y 10 fg cuando se observa en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (68). Otros iniciadores para amplificar fragmentos de 123 pb (50,76) y 263 pb mediante los iniciadores ISL1 e ISL2 (66,67) mostraron una sensibilidad y especificidad para detectar *M. tb* similares al anterior, en cultivos y muestras clínicas, mejor que la amplificación de fragmentos de la secuencia del gene *Gro EL*, que se encuentra en una sola copia en el genoma de las micobacterias.

Las pruebas de PCR con fragmentos de IS6110 han mostrado especificidad para detectar micobacterias del complejo *M. tb* y no han evidenciado reactividad con el ADN de *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *N. asteroides*, *E. coli*, *S. aureus*, *M. chalybeata*, *S. lividans*, *S. hygroscopicus*, *S. viridochromogenes*, *S. antibioticus*, *S. fradiae* (65).

<u>CGA</u> <sup>RD</sup> <u>TGAACCGCCCGGCATGTCGGAGACTC</u> <sup>RI</sup> <u>CAGTCTTGGA</u> <u>AAGGATGGGGTCAT</u>	56
GTCAGGTGGTTCATCGAGGAGTACCCGCCGGAGCTGCGTGAGCGGGCGGGTGCGGATGG	115
TCGCAGAGATCCGCGGTGAGCAGATTCCGAGTGGGCAGCGATCAGTGAGGTCCGCCGT	174
CTACTTGGTGTGGCTGCGCGGAGACGGTGCGTAAGTGGTGCGCCAGGCGCAGGTGCA	233
TGCCGGCGCACGGCCCGGGACCACGACCGAAGAATCCGCTGAGCTGAAGCGCTTAGCGG	292
CGGGACAACGCGGAATTGCGAAGGGCGAACCGGATTTAAAGACCGCGTCCGGCTTTCTT	351
CGCGGCCGAGCTCGACCGGCCAGCACGCTAATTAACGGTTCATCGCCGATCATCAGGGC	410
CACCGCGAGGGCCCGATGGTTGCGGTGGGGTGTGAGTGCATCTGCACACAGCTGAC	469
CGAGCTGGGTGTGCCGATCGCCCATCGACCTACTACGACCACATCAACCGGGAGCCCA	528
GCCGCCGCGAGCTGCGCGATGGCGAACTCAAGGAGCACATCAGCCCGCTCCACGCCGCC	587
AACTACGGTGTTTACGGTGCCCGCAAAGTGTGGCTAACCCCTGAACCGTGAGGGCATCGA	646
GGTGGCCAGATGCACCCGTCGAACGGCTGATGACCAAACCTCGGCCTGTCCGGGACCACCC	705
GCGGCAAAGCCCGCAGGACCACGATCGCTGATCCGGCCACAGCCCGTCCGCGCAT <sub>P1</sub> C	762
<b>TCGTCCAGCGCCGCTTCGG</b> ACCACCCAGCACCTAACCGGCTGTGGGTAGCAGACCTCAC	821
TATGTGTCGACCTGGGCAGGTTCCGCTACGTGGCCTTTGT <b>CACCGACGCTACGCTCG</b>	880
<b>CAGG</b> <sub>P1</sub> ATCCTGGGCTGGCGGGTTCGCTTCCACGATGGCCACCTCCATGGTCTCGACGC	937
GATCGAGCAAGCCATCTGGACCCGCCAACAGAAGGCGTACTCGACCTGAAAGACGTTA	996
TCCACCATACGGATAGGGGATCTCAGTACACATCGATCCGGTTCAGCGAGCGGCTCGCC	1055
GAGGCAGGCATCCAACCGTCGGTCCGGAGCGGTCCGAAAGCTCCTATGACAAATGCACTAGC	1114
CGAGACGATCAACGGCTATACAAGACCGAGCTGATCAACCCGGCAAGCCCTGGCGGT	1173
CCATCGAGGATGTCGAGTTGGCCACCGCGCGCTGGGTGCGACTGGTTCAACCATCGCCGC	1232
CTCTACCACTACTCGGGCAGCTCCCGCCGGTCCGAAGCTCGAGGCTGCCTACTACGCTCA	1291
ACGCCAGAGACCAGCCCGCGGCTGAGGTCTCAGATCAGAG <sub>P1</sub> AGTCTCCGGACTCACCG	1348
<u>GGGCGGTTCA</u> <sub>P2</sub> <u>CGA</u>	1361

Figura 1. Secuencia IS6110 del complejo *M. tb*

RD: Secuencia repetida directa, RI: Secuencia repetida invertida, P1: oligonucleótido iniciador, P2: oligonucleótido iniciador

### 5.3. METODOS DE EXTRACCION DE ADN DE BACTERIAS

Para extraer ADN se pueden utilizar diferentes procedimientos dependiendo del tamaño del ADN que se quiere obtener, los usos que se le darán y la clase de célula donadora del ADN.

En general la lisis de las células puede lograrse utilizando detergentes iónicos o no iónicos, solventes orgánicos, álcalis, calor o enzimas como la lisozima y la proteínasa K que actúan sobre los componentes proteícos, lipídicos y carbohidratos de la pared celular y las membranas liberando el ADN (78,79).

La extracción se puede realizar con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La extracción con fenol es el mejor método para purificar ADN de extractos celulares e inactiva la endonucleasa A presente en algunas cepas de *E. coli*.

La precipitación se realiza generalmente con etanol en presencia de sales que permiten la recuperación de moléculas de ADN de alto peso o fragmentos de cadena simple o doble y también de ARN. El ADN de alto peso molecular es precipitado muy bien por etanol frío.

De las sales, el acetato de amonio es más eficaz para remover impurezas que el acetato de sodio y es más conveniente cuando se trabaja con fragmentos pequeños de ADN como el recuperado de geles que contiene muchas impurezas. También las sales de nucleótidos de amonio son más solubles en etanol que las de nucleótidos de sodio y si se requiere una cantidad exacta de nucleótidos de trifosfato es esencial aprovechar esta propiedad y usar acetato de amonio para eliminar los nucleótidos libres presentes en la solución de ADN. Además es importante considerar que cuando se trabaja con el ADN en solución los restos de metales pesados, detergentes o cualquier otro componente son potentes inhibidores de las endonucleasas de restricción y otras enzimas como la ligasa de ADN o la kinasa de polinucleótido. Cuando se va a purificar relativamente grandes

cantidades de ADN de células eucarióticas es más conveniente usar acetato de sodio (79).

Algunos protocolos incluyen digestión con RNAsa, sin embargo esta genera fragmentos que pueden actuar como sustratos para varias enzimas entre ellas la transferasa y la kinasa.

El etanol se puede usar para recuperar pequeñas o grandes cantidades de moléculas de ADN cuya concentración puede variar de unos pocos nanogramos a microgramos por  $\mu$ l de la solución. La solución puede ser incubada a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 15 a 20 minutos o a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, el precipitado se recupera por centrifugación en micrófuga a 12.000 rpm durante 10 minutos. Cuando los polisacáridos están presentes se debe preferir la precipitación  $-20^{\circ}\text{C}$ , ya que estos precipitan más fácilmente a  $-70^{\circ}\text{C}$  (79).

El tiempo y la temperatura de incubación y el tiempo de centrifugación influyen en la concentración del ADN recuperado, haciendo necesario considerar este aspecto cuando se están manipulando muy bajas concentraciones de ADN. El mejor resultado con la precipitación a  $4^{\circ}\text{C}$  en presencia de bajas concentraciones de ADN se obtiene cuando se centrifuga por 10 minutos, esto puede deberse a que el etanol al 75%, en cantidad de 3 volúmenes por uno de la muestra a  $-70^{\circ}\text{C}$  es viscoso, retardando la migración del precipitado de ADN, pero usando tiempos de centrifugación más largos este problema debe eliminarse, por ejemplo centrifugar por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de incubación a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  no tiene efecto sobre la recuperación del ADN después de 10 minutos de centrifugación (79).

Cuando la solución se mezcla con alcohol absoluto y se centrifuga inmediatamente, también tiempos más largos de centrifugación aumentan la cantidad de ADN recuperado.

Una vez el ADN ha sido precipitado y lavado puede secarse y resuspenderse en agua. La concentración se determina con fluorometría o espectrofotometría a 260 nm.

Con los métodos empleando tiocianato de guanidinium y partículas de sílica o diatomeas como portadores de ácidos nucleicos, para extraerlos de muestras clínicas, los ácidos nucleicos liberados de las células lisadas se unen con el portador formando complejos que deben ser rápidamente sedimentados por centrifugación, lavados, secados y resuspendidos en el buffer de reacción (80). Este método permite un buen rendimiento y pureza en el ADN obtenido de muestras clínicas.

#### **5.4. METODOS DE PURIFICACION DE ADN DE MUESTRAS EMBEBIDAS EN PARAFINA**

La extracción de ADN de tejidos previamente fijados en formaldehído amortiguado y embebidos en parafina ha hecho posible la amplificación de fragmentos de ADN contenidos en tejidos guardados hasta por 40 años. Goelz y col. (24) extrajeron ADN de muestras no fijadas, fijadas y fijadas embebidas en parafina. El rendimiento del ADN varió entre 0.5 y 3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido. El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos de tejidos con menos de 5 años de edad fué de 100 a más de  $10^4$  pb, la mayoría entre 100 y 1500 pb. El método empleado en este protocolo requiere un tiempo aproximado de 4 días.

Impraim y col. (25) realizaron PCR para detectar alteraciones en los alelos de la B globina en el ADN extraído de bloques guardados, embebidos en parafina con éxito.

Shibata y col. (27) Detectaron mediante PCR el gene de la B globina y el gene E6 del virus del papiloma humano en tejidos embebidos en parafina y almacenados hasta por 40 años.

Wright y col. (28) recomiendan disolver la parafina de las secciones del tejido de 5 a 10  $\mu\text{m}$ , utilizando octano o xileno en 2 ocasiones y lavando con etanol absoluto en dos ocasiones.

Para hacer la digestión se recomienda adicionar 100  $\mu$ l de buffer de digestión (TRIS 50mM pH 8.5, EDTA 1mM, más lauril 12 al 1%, o Tween 20 al 0.5%) que contiene 200  $\mu$ g/ml de proteinasa K, (las muestras con gran cantidad de tejido deberán resuspendirse en el buffer de digestión) incubar por 3 h a 55°C o por toda la noche a 37°, y luego a 95°C por 8 a 10 minutos para inactivar la proteasa. Para usarlo para PCR se deberá centrifugar por 30 segundos para remover cualquier exceso de parafina o tejido y se empleará una alícuota (1 a 10  $\mu$ l) de sobrenadante, aunque las extraídas de muestras con abundante tejido pueden amplificarse con 0.1  $\mu$ l para 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción de PCR. Las muestras pueden almacenarse a -20°C.

Los ciclos de PCR deben modificarse en el tiempo: 95°C por 1min, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, durante 40 ciclos y la extensión final a 72°C por 3 a 5 minutos.

## 5. 5. METODOS DE AMPLIFICACION DE ADN

El PCR es un método que permite la síntesis in vitro de secuencias de ADN específicas, mediante el uso de la enzima taq polimerasa y dos oligonucleótidos iniciadores que hibridan a la región opuesta de los extremos de la banda de ADN blanco (81,82,83).

El método fué inventado por Kary Mullis e inicialmente aplicado en la amplificación de ADN de la B globina humana y el diagnóstico prenatal de la anemia de células falciformes. Este método permite doblar aproximadamente en cada ciclo el número de secuencias de ADN blanco (84).

Un ejemplo de procedimiento que podría servir de guía con las correspondientes modificaciones según el ADN con que se vaya a trabajar, recomendado por Innis y col. (83) es el siguiente:

En un tubo microfuga de 0.5 ml preparar 100  $\mu$ l de reacción conteniendo: 100000-1000000 de moléculas de ADN a amplificar, 20 pmol de cada iniciador ( $T_m >55^\circ\text{C}$ ), 20

mM TRIS HCL (pH 8.3) (20°C), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 25 mM, Tween 20 al 0.05%, 100 ug/ml de gelatina pasada por autoclave, o albúmina sérica bovina libre de nucleasa, dNTP 50 µM de cada uno, 2 unidades de taq polimerasa de ADN. Se hacen 25-35 ciclos con denaturación de 15 segundos a 96°C, primera hibridación 30 segundos a 55°C, primera extensión 1.5 min a 72°C, y extensión final a 72°C por 5 minutos, las reacciones se paran por enfriar a 4°C o por adicionar EDTA a 10 mM.

## 5. 6. IDENTIFICACION DE LA ESPECIFICIDAD DE UN FRAGMENTO DE ADN

La especificidad de un determinado fragmento de ADN, producto o no de PCR, se puede lograr mediante varios métodos (85).

Hibridación con sondas de oligonucleótidos sintéticos complementarias a la secuencia específica que se va a determinar, las condiciones de hibridación deben ser cuidadosamente controladas.

Procesamiento con enzimas específicas del sustrato de ADN, entre ellas endonucleasas de restricción, polimerasas, ligasas y ribonucleasas (86).

La técnica más común es el souther blot: La presencia variable de secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción produce fragmentos de tamaño variado cuando el ADN genómico de diferentes individuos se somete a digestión enzimática. Los fragmentos son entonces separados por electroforesis en gel de agarosa, se transfieren a una membrana y se identifican con una sonda marcada con material radioactivo. Con esta técnica cualquier segmento de ADN clonado puede ser sonda sin necesidad de ser secuenciado, sin embargo tiene limitaciones como: el tiempo empleado en el análisis es de días, la técnica es relativamente compleja y de difícil automatización para su uso rutinario, requiere el uso de material radioactivo que tiene problemas de seguridad y estabilidad, no todas las variantes de secuencias son reconocidas por los cientos de

enzimas de restricción existentes y se requiere relativamente gran cantidad de ADN genómico para poder analizarlo.

Alternativamente la sonda de hibridación puede marcarse con diferentes sustancias, sustratos de enzimas o antígenos y detectarse por productos de las reacciones enzimáticas o anticuerpos y también pueden marcarse los iniciadores para obtener un producto de PCR ya marcado.

El uso de sondas de oligonucleótidos no radioactivos, para analizar la secuencia de los productos de PCR (87) tiene ventajas ya que las sondas no radioactivas son muy estables, la metodología permite su realización en gran número de muestras y en laboratorios no equipados para trabajar con material radioactivo, además disminuye en una gran proporción el tiempo necesario para obtener el diagnóstico.

El método basado en el formato de dot blot requiere un producto de PCR en suficiente cantidad para ser visualizado en un gel de Nu Sieve al 3% más agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml de agua. Se necesitan 20  $\mu$ l del producto de PCR (50-100 ng) por mancha/sonda.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. MATERIALES

#### 6.1.1. Cultivos

Las micobacterias fueron crecidas en medio Lowestein Jensen . Se utilizaron *M. tb* H37Rv, *M. bovis* ATCC 35734, *M. kansasii* TCM 1201, *M. avium*, *M. avium intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *N. asteroides* y *N. brasilienses* se crecieron en medio Sabureau. La *E. coli* en medio líquido LB y también se utilizaron linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica.

#### 6.1.2. Biopsias

Se utilizaron fragmentos de biopsias de un tamaño de 10 micras previamente fijadas en formaldehído al 10% en agua y embebidas en parafina. Las biopsias fueron tomadas del archivo de patología del "INNSZ" entre las realizadas de 1987 a 1992. Las biopsias fueron 8 con cultivo positivo para *M. tb*, 5 de pulmón y 3 de ganglio linfático, las otras fueron 3 de ganglio linfático con cultivo positivo para *M. bovis*. Las biopsias controles negativos fueron 30, correspondientes a biopsias hepáticas de pacientes con cirrosis, linfoma, criptococosis, histoplasmosis, candidiasis, infección por *M. avium-intracellulare*, *M. xenopi*, hepatitis viral, esteatosis hepática e hígados normales (Tablas 2 y 3). El diagnóstico de éstas biopsias se estableció mediante el examen histopatológico del hígado, la tinción y/o el cultivo del tejido hepático.

Biopsias con HG : Se procesaron 80 biopsias entre las diagnosticadas como granulomatosas en el "INNSZ" entre el 1o de enero de 1987 y el 31 de diciembre de 1991.

**Tabla 2. Biopsias con cultivo positivo a micobacterias del complejo M.tb**

No DE BIOPSIA	ORGANO	CULTIVO	TINCION DE ZN	DIAG. DE BASE
Q91-3234	pulmón	M.tb	positiva	TB generalizada
Q92-2558	pulmón	M.tb	positiva	HIV
Q92-759A	pulmón	M.tb	positiva	HIV
Q92-759B	pulmón	M.tb	positiva	HIV
Q92-759C	pulmón	M.tb	positiva	HIV
Q89-563B	Gan. linfático	M.tb	negativa	TB pulmonar curada
Q87-955	Gan. linfático	M.tb	negativa	HIV
Q89-3345	Gan. linfático	M.tb	positiva	Transplante hepático
Q89-2195	Gan. linfático	M. bovis	negativa	HIV
Q87-2281A	Gan. linfático	M. bovis	positiva	HIV
Q87-2281B	Gan. linfático	M. bovis	positiva	HIV

**Tabla 3. Biopsias con patologías no TB e hígados normales**

<b>Nº DE BIOPSIA</b>	<b>DIAG. HISTOLOGICO</b>	<b>CULTIVO</b>	<b>TINCION ZN/PAS</b>
Q80-2491	hígado con necrosis	Candida spp	positiva
Q81-3483	HQ	NR *	positiva
Q81-1776	HQ	negativo	positiva
Q86-3778	HQ	M. nonagii	positiva
A87-60N	HQ	M. avium-intracelulare	positiva
A88-46J	HQ	M. avium-intracelulare	positiva
A87-60K	HQ	M. avium-intracelulare	positiva
A88-46C	HQ	M. avium-intracelulare	positiva
Q81-8030	cirrosis hepática	NR	NR
Q82-249	cirrosis hepática	NR	NR
Q82-178	cirr. biliar primaria	NR	NR
Q82-282	cirrosis hepática	NR	NR
Q82-231B	cirr. biliar primaria	NR	NR
Q81-3001	fibrosis portal	NR	NR
Q82-116	colestasis	NR	NR
Q81-168D	hígado normal	NR	NR
Q82-68	hepatitis crónica	NR	NR
Q82-178	hepatitis crónica	NR	NR
Q82-188	hepat. viral aguda	NR	NR
Q82-177B	linfoma hepático	NR	NR
Q82-177A	linfoma hepático	NR	NR
Q82-1337C	linfoma hepático	NR	NR
Q82-270	osteosarcoma hepático	NR	NR
Q82-6A	osteosarcoma hepático	NR	NR
Q82-66	osteosarcoma hepático	NR	NR
Q86-1862A	Ca metastásico	NR	NR
Q81-3168	Ca metastásico	NR	NR
Q82-284A	hígado normal	NR	NR
Q81-473C	hígado normal	NR	NR
Q82-206	hígado normal	NR	NR

\* No realizado

### 6.1.3. Iniciadores

5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG 3' Y 5' CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3' para amplificar un fragmento de 123 pb de la secuencia de inserción IS6110 del complejo *M. tb* (Figura 1).

## 6.2 PROCEDIMIENTOS

El diseño metodológico se puede observar en la figura 2.

### 6.2.1. Extracción del ADN de las micobacterias cultivadas

De cada especie de micobacteria cultivada se extrajo el ADN por el siguiente método:

a) La micobacteria se retiró del medio de cultivo mediante un aplicador estéril y se resuspendió en 320  $\mu$ l de TE pH 8. b) Se adicionó 50  $\mu$ l de lisozima al 3.3% en TE pH 8 recién preparada, se mezcló por inmersión y se incubó a 37°C por 15 minutos. c) Se adicionó 30  $\mu$ l de SDS al 20%, se mezcló e incubó a 65°C por 15 minutos mezclando ocasionalmente por inmersión. d) Se adicionó 100  $\mu$ l de NaClO<sub>4</sub> 5 M se mezcló y dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. e) Se adicionó un volumen (500  $\mu$ l) de fenol-cloroformo (1:1) y se mezcló por 30 minutos, en seguida se centrifugó en microfuga a 12.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. f) Se extrajo la fase acuosa teniendo cuidado de no tomar la interfase proteica y se colocó en otro tubo adicionando 500  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), se mezcló por 5 minutos y se centrifugó por 5 minutos a temperatura ambiente. g) Se extrajo de nuevo la fase acuosa determinando el volumen (aproximadamente 440  $\mu$ l) y se adicionó 1/10 del volumen de acetato de Na 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 99%, mezclando e incubando a -20°C por 1 hora con el fin de precipitar el ADN. h) Se centrifugó por 15 minutos a temperatura ambiente en microfuga, se descartó el sobrenadante y se adicionó 500  $\mu$ l de etanol al 75% para lavar el sedimento, centrifugando de nuevo por 5 minutos a temperatura ambiente. i) Se descartó el sobrenadante, se secó el sedimento por

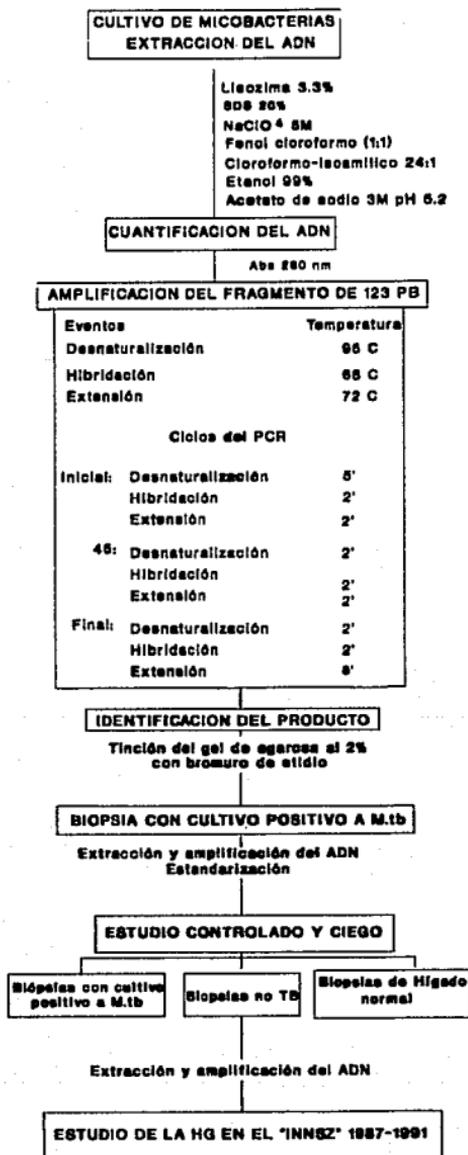


Figura 2. Diseño experimental

evaporación del etanol y se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua destilada deionizada. La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm.

#### **6.2.2. Extracción del ADN de los linfocitos humanos de sangre periférica**

a) Se tomaron 25 ml de sangre periférica con 3 ml de anticoagulante EDTA pH 7.3 al 5% y se centrifugó a 3000 rpm en una centrifuga Beckman modelo TJ-6 durante 10 minutos a 4°C. b) Se separó la capa de leucocitos y se colocó en otro tubo adicionándole 20  $\mu$ l de solución para lisar globulos rojos ( TRIS pH 7.6, 10 mM; MgCl 5 mM y NaCl 10 mM), se mezcló y centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. c) El sedimento se resuspendió en 1 ml de solución de lisis de glóbulos rojos y se le adicionó 4 ml de solución para lisis de glóbulos blancos con proteínasa K 200  $\mu$ g/ml, se mezcló e incubó a 55°C durante toda la noche. d) Para la extracción se adicionó un volumen de fenol saturado se mezcló y centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C tomando el sobrenadante y repitiendo este procedimiento. e) se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) se mezcló y centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C repitiendo una vez el procedimiento. f) Al sobrenadante se le adicionó NaCl a concentración final 100 mM y un volumen de isopropanol, se mezcló y dejó durante 10 minutos a -20°C. g) Se tomó el ADN con una pipeta Pasteur se lavó con etanol al 75% frío y se resuspendió en agua destilada deionizada para PCR.

#### **6.2.3. Extracción de ADN de *E. coli***

a) La bacteria se sembró en medio líquido LB y se incubó toda la noche a 37°C con agitación, se distribuyó el medio en tubos de 13 ml, se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos. b) El paquete bacteriano se resuspendió en 10 ml de solución salina citrato 1x y se distribuyó en 20 tubos eppendorf de 500  $\mu$ l se centrifugó en microfuga a 12000 rpm durante 2 minutos. c) El sedimento de cada tubo se resuspendió en 250  $\mu$ l de solución salina citrato 1x y se adicionó 250  $\mu$ l de solución de lisis 2x (glucosa 100 mM, EDTA 20 mM, TRIS-HCl pH8 50 mM) con lisozima a una concentración final de 8 mg/ml y 10  $\mu$ l de NaCl a una concentración final de 0.15 M, se mezcló y se incubaron los tubos destapados a temperatura ambiente durante 10 minutos. d) Se mezcló con un volumen equivalente de fenol saturado centrifugando en microfuga durante 10 minutos a 4°C

decantando las fases acuosa y orgánica. e) El precipitado blanco se resuspendió en fenol cloroformo, se centrifugó por 2 minutos a 4°C recolectando el precipitado en 4 tubos eppendorf. f) Se le adicionó cloroformo-álcool isoamílico (24:1), se centrifugó durante 2 minutos a 4°C eliminando el sobrenadante y lavando el precipitado con éter. g) Se centrifugó por 2 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante y secando por evaporación del éter. h) El sedimento se resuspendió en 500 µl de TE 1x más 1 ml de proteínasa K a una concentración de 300 µg/µl, se incubó toda la noche a 55°C y se realizaron 2 extracciones con fenol saturado, 2 con fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y 2 con cloroformo-isoamílico (24:1). i) El sobrenadante se mezcló con un volumen equivalente de isopropanol y NaCl a una concentración final de 100 mM recuperando el ADN y lavándolo con etanol al 70% y éter. j) El ADN se resuspendió en 500 µl de TE 1x, calentando a 65°C y se trató con 5 µl de RNAasa (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C.

#### 6.2.4. Estandarización de la amplificación del ADN procedente de las micobacterias cultivadas

Utilizando los iniciadores previamente descritos se amplificó inicialmente el ADN de *M. tb* ATCC 103C para establecer las condiciones óptimas de PCR (concentración de los iniciadores, de MgCl<sub>2</sub>, taq polimerasa de ADN y número de ciclos) que mejor evidenciaran el fragmento de 123 pb en el gel de agarosa y luego el procedimiento se realizó con el ADN de cada una de las especies de micobacterias, nocardias, *E. coli* y ADN de los linfocitos humanos, para evaluar que los iniciadores amplificaran el fragmento, únicamente en las especies del complejo *M. tb*.

El procedimiento de amplificación que finalmente se utilizó fué el siguiente: En un tubo microfuga de 0.5 ml se preparó 50 µl de mezcla de reacción conteniendo 20 pg de ADN de la muestra, buffer de reacción (MgCl<sub>2</sub> 25 mM) 5 µl, mezcla de nucleótidos trifosfatados (1.25 mM de cada uno) 8 µl, oligonucleótidos iniciadores 60 ng (1 µl) y una unidad de taq polimerasa. La mezcla de reacción se cubrió con 35 µl de aceite mineral y antes de adicionar la taq polimerasa se sometió a 95°C durante 5 minutos para inactivar cualquier proteasa. El cicladore de PCR se programó para 47 ciclos así: primer ciclo: denaturación 5 minutos a 95°C, hibridación 2 minutos a 68 °C y extensión 2 minutos a 72°C. Durante

35 ciclos: denaturación 2 minutos a 95°C, hibridación 2 minutos a 68°C y extensión 2 minutos con auto extensión de 2 segundos en cada ciclo a 72 °C. Un ciclo final con denaturación de 2 minutos a 95 ° C, hibridación 2 minutos a 68 °C y extensión 8 minutos a 72 °C. En cada experimento se incluyeron dos controles negativos que no contenían ADN y un control positivo con el ADN de *M. tb* ATCC 103C.

#### **6.2.5. Identificación del producto de PCR**

Se realizó mediante separación del producto en gel de agarosa al 2% (70 volts, 1,5 horas) utilizando 20 µl del producto de PCR más 5 µl de colorante ladder (azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanole 0.25%, glicerol 30%), para la electroforesis se utilizó buffer TBE 1x (TRIS, BORATO, EDTA) y la tinción se realizó con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml en agua durante 30 minutos evaluando si su peso corresponde al producto de 123 pb, indicado por el marcador de peso molecular ladder 123 pb.

#### **6.2.6. Procesamiento de las biopsias**

De cada biopsia por medio del micrótopo se obtuvieron cortes de 10 micrómetros teniendo especial cuidado en limpiar con xileno la hoja entre corte y corte para prevenir la contaminación cruzada de las muestras con ADN y/o micobacterias completas.

**6.2.4.1. Desparafinación.** a) Cada corte fué tratado con 700 µl de xileno a 50°C durante 15 minutos, centrifugado por 3 minutos decantando el sobrenadante y repitiendo el procedimiento 1 vez. b) Se lavó con 500 µl de etanol absoluto centrifugando por 90 segundos decantando y repitiendo el procedimiento una vez. c) Se secó a temperatura ambiente después de adicionar una gota de acetona.

**6.2.4.2. Extracción de ADN.** Para la extracción de ADN de las biopsias se eligió el procedimiento que dió el mejor rendimiento y visualización de la banda de ADN correspondiente en el gel de agarosa, después de probar el método empleado en la extracción de ADN de cultivos, con prolongación del tiempo de exposición a lisozima y

SDS y otro con proteínasa K en su buffer de lisis con y sin extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico. El método elegido fué: a) Cada muestra de tejido se suspendió y homogenizó en 320 µl de TE pH 8 (Tris 10 mM y EDTA 1 mM) y se le adicionó 50 µl de lisozima en TE al 3.3% incubando por 1 hora a 37°C. b) Se adicionó 30 µl de SDS al 20% y se incubó por una hora a 65°C. c) Se adicionó 100 µl de proteínasa K 2 mg/ml de buffer de lisis (TRIS 50 mM, Tween 20 al 0.5%, EDTA 1 mM) y se incubó durante 18 horas a 55°C. d) Se adicionó 100 µl de NaClO<sub>4</sub> 5 M, mezclando por 10 minutos a temperatura ambiente. e) Se adicionó 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mezclando por 30 minutos, centrifugando por 15 minutos a 14.000 rpm y recuperando la fase acuosa. f) Se adicionó 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mezclando por 15 minutos, centrifugando por 10 minutos a 14.000 rpm y recuperando la fase acuosa. g) Se adicionó 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 guardando los tubos a -70 °C por 2 horas y centrifugando durante 15 minutos a 14.000 rpm. h) Se decantó y se adicionó 500 µl de etanol al 75% centrifugando por 10 minutos a igual velocidad. i) Se decantó y se secó a temperatura ambiente resuspendiendo en agua para PCR. La concentración de ADN se determinó en espectrofotómetro a 260 nm.

**6.2.4.3. Amplificación en el ADN procedente de las biopsias.** De la muestra procedente de cada biopsia se tomó 2 µg de ADN y se suspendió en 50 µl de mezcla de reacción conteniendo iguales reactivos mencionados para la amplificación del ADN extraído de las micobacterias cultivadas, aumentando el número de ciclos a 52 así: primer ciclo: denaturación por 5 minutos a 95°C, hibridación por 2 minutos a 68°C y extensión por 2 minutos a 72°C. Durante 50 ciclos: denaturación por 2 minutos a 95°C, hibridación por 2 minutos a 68°C y extensión por 2 minutos con auto extensión de 2 segundos en cada ciclo a 72°C y un ciclo final de denaturación por 2 minutos a 95°C, hibridación por 2 minutos a 68°C y extensión por 8 minutos a 72°C.

El procedimiento de amplificación se realizó inicialmente con el ADN procedente de una biopsia que tenía cultivo positivo para *M. tb*. Con esta biopsia se determinó la concentración óptima de ADN total de la biopsia que mejor evidenciaba el producto.

**6.2.4.4. Identificación del producto.** Se realizó en las mismas condiciones previamente establecidas.

**6.2.5. Estudio controlado y ciego para evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba en biopsias**

El procedimiento de amplificación se aplicó en forma ciega a 41 biopsias, 11 con cultivo positivo para *M. tb* o *M. bovis* y 30 biopsias de hígado con patologías neoplásicas, metabólicas, e infecciosas no TB, o sin ninguna patología (Tablas 2 y 3). Las biopsias fueron previamente re-examinadas por el Patólogo para confirmar el diagnóstico.

**6.2.6. Aplicación de la prueba de PCR para el diagnóstico etiológico de las biopsias con HG**

Se seleccionaron los diagnósticos histopatológicos de HG en los últimos 10 años en el "INNSZ" mediante la revisión de los archivos de patología de biopsias, se realizaron cortes de los bloques de parafina correspondientes, con las mismas precauciones anteriormente apuntadas.

De cada sección elegida se extrajo el ADN y se sometió a amplificación por el método ya estandarizado.

Se correlacionó en forma ciega el resultado obtenido por PCR con el diagnóstico establecido por histopatología, cultivo, tinciones, serología, PPD, y respuesta al tratamiento según las siguientes definiciones y además se agruparon de acuerdo a si eran pacientes infectados o no por HIV.

### 6.3. DEFINICIONES

**HEPATITIS GRANULOMATOSA:** El hallazgo de al menos un granuloma en el estudio histológico de tejido hepático obtenido por biopsia.

**GRANULOMA:** Discreto nódulo, bien definido, de 0.5 a 2 mm de diámetro, formado por agregados de células epiteloideas o macrófagos, rodeados por un anillo de células mononucleares predominantemente linfocitos y algunas veces presencia de células gigantes y necrosis caseosa central.

**HG TUBERCULOSA:** Cuando en el cultivo del tejido hepático se identificó *M. tb*.

**HG PROBABLEMENTE TUBERCULOSA:** Cuando la HG sin cultivo positivo a *M. tb* en el hígado, lo mismo que sin bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en el hígado u otro sitio ha respondido al tratamiento antituberculoso o en el cultivo de otro órgano diferente al hígado, líquido o secreción durante el mismo episodio de enfermedad se ha aislado *M. tb* y no se encontró ninguna otra enfermedad infecciosa, neoplásica, del colágeno o tóxica conocida relacionada con HG.

**HG POSIBLEMENTE TUBERCULOSA:** La asociada a un cuadro clínico compatible con TB y PPD positivo, cuando no se aisló *M. tb* en el cultivo del hígado u otro sitio o este no se realizó, igualmente no se visualizaron BAAR en el hígado u otro sitio, tampoco se encontró otra enfermedad infecciosa, neoplásica, del colágeno o tóxica conocida relacionada con HG y además no se realizó tratamiento antituberculoso o evaluación de la respuesta a este.

**HG ASOCIADA A BAAR EN EL HIGADO U OTRO SITIO:** Los casos en los que la tinción para BAAR fué positiva en el hígado u otro sitio y el cultivo fué negativo a *M. tb*

y además no se encontró otra enfermedad infecciosa, neoplásica, del colágeno o tóxica conocida relacionada con HG.

**HG CON MICOBACTERIAS NO TB EN EL HIGADO U OTRO SITIO:** Los casos asociados a aislamiento de micobacterias no TB en el hígado u otro sitio y ausencia de otra enfermedad infecciosa, neoplásica, del colágeno o tóxica conocida relacionada con HG.

**HG DE ETIOLOGIA NO TUBERCULOSA:** Granulomas con cultivo positivo para otro gérmen distinto a *M. tb*, o tinción positiva para hongos, treponemas, parásitos o virus, o estudio histopatológico del hígado diagnóstico de neoplasia o enfermedad del colágeno, o tóxica conocida relacionada con HG.

**HG DE ETIOLOGIA NO CLASIFICABLE:** Granulomas en los que no se identificó *M. tb* en el hígado u otro sitio, ni otro microorganismo (micobacteria, bacteria, hongo, parásito o virus), o enfermedad neoplásica, del colágeno o tóxica conocida relacionada con HG, o no se encontró el expediente clínico y tampoco tenía cuadro clínico de TB.

**TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO:** Ingestión de al menos 2 fármacos anti-tuberculosos por al menos 2 meses en forma continua.

**PPD POSITIVO:** Induración igual o mayor a 10 mm.

**RESPUESTA ADECUADA AL TRATAMIENTO:** Mejoría de las pruebas de funcionamiento hepático (FA, TGO, TGP, BT) y/o desaparición de los granulomas dentro de los 2 primeros meses de tratamiento con mejoría del estado general y la fiebre en el caso que estuvieran presentes.

**MEJORA DE LAS PRUEBAS DE FUNCION HEPATICA:** Cuando a los 2 meses de iniciado el tratamiento antituberculoso se observó una disminución del 50% o más en el exceso inicial de las pruebas hepáticas, esto es, la cantidad por encima del valor superior normal. Así:  $VF-Vn$  dividido entre  $Vi-Vn < 0.5$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. EXTRACCION Y AMPLIFICACION DEL ADN DE LAS MICOBACTERIAS

La técnica utilizada para la extracción de ADN a partir de las micobacterias en cultivos y reproducible al menos 5 veces permite obtener una cantidad y calidad de ADN adecuadas en cuanto a pureza y tamaño, observadas por medición espectrofotométrica y en el gel de electroforesis al 0.8% para evaluar ADN de alto peso molecular (Figura 3).

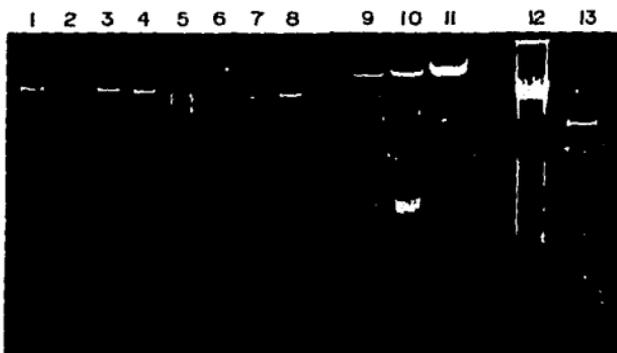


Figura 3. ADN extraído de las micobacterias, *E. coli*, y linfocitos humanos

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml de agua. En las líneas: 1) *M. scrofulaceum*, 2) *M. goodii*, 3) *M. avium*, 4) *M. avium-intracellulare*, 5) *M. kansasii*, 6) *M. bovis*, 7) *M. tb H37Rv*, 10) *E. coli* BH101 (sin RNasa) 11) *E. coli* BH101 (con RNasa), 12) Linfocitos humanos, 8,9 y 13) Marcador estándar de alto Kpb.

La amplificación de un fragmento de 123 pb se detecta con el control positivo, ADN de *M. tb ATCC 103C* en las condiciones de PCR estandarizadas, y aparece hasta con la mínima cantidad de ADN evaluada de 10 fg (Figura 4).

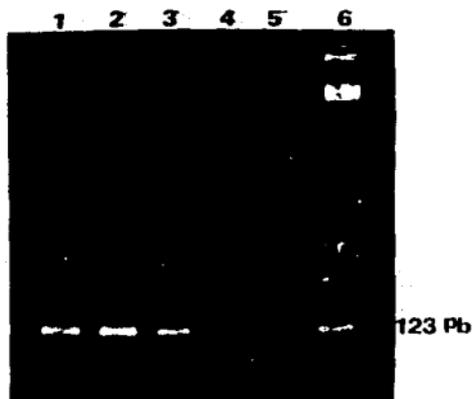


Figura 4. Sensibilidad del PCR para detectar el fragmento de 123 pb en el ADN de *M. tb* ATCC 103C

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml de agua. En las líneas: 1) 1 pg; 2) 0.5 pg, 3) 100 fg, 4) 10 fg, 5) Control sin ADN, 6) Marcador de Kpb.

## 7.2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL PCR EN CULTIVOS DE MICOBACTERIAS

Al amplificar el ADN de las diferentes micobacterias, nocardias, *E. coli* y linfocitos utilizando 1 pg de ADN de cada uno, el producto de 123 pb se detectó en el gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio sólo en las muestras de ADN de *M. tb*, *M. bovis* y el control positivo (ADN de *M. tb* ATCC 103C). Este producto no se detectó en la muestra de ADN procedente de *M. kansasii*, *M. avium*, *M. avium-intracellulare*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *N. asteroides*, *N. brasilienses*, *E. coli* y en el ADN de los linfocitos humanos, resultando una sensibilidad y especificidad del 100% (Figura 5).

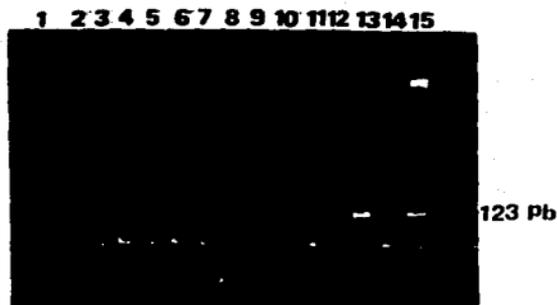


Figura 5. Especificidad del PCR en el ADN extraído de varios microorganismos y los linfocitos humanos

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml de agua, la concentración de ADN usada para el PCR fué de 1 pg. En las líneas: 1, 14) Control de reactivos, 2) Linfocitos humanos, 3) *E. coli* BH101, 4) *N. asteroides*, 5) *N. brasilienses*, 6) *M. avium*, 7) *M. avium-intracellulare*, 8) *M. scrofulaceum*, 9) *M. kansasii*, 10) *M. gordonae*, 11) *M. bovis*, 12) *M. tb* H37Rv, 13) *M. tb* ATCC 103C, 15) Marcador de Kpb 123pb.

### 7.3. ESTANDARIZACION DE LA EXTRACCION Y AMPLIFICACION DEL ADN DE LAS BIOPSIAS

El procedimiento utilizado para la extracción de ADN de la biopsia con cultivo positivo a *M. tb* purificó un ADN en cantidad y calidad adecuadas para producir la señal positiva en la reacción de amplificación. La cantidad de ADN extraída de cada biopsia varió entre 2.5 y 88 µg.

La modificación en el número de ciclos del ensayo de PCR, así como en el volumen del producto de PCR utilizado en el gel de agarosa, incrementándolos, permitió una

visualización mejor definida del fragmento de ADN amplificado, aunque con 30 ciclos el producto de PCR ya era detectable.

La sensibilidad de la amplificación del producto de 123 pb en la biopsia positiva para *M. tb* se valoró con cantidades de ADN entre 10 pg y 10<sup>5</sup> µg. La detección de una banda muy bien definida se observó entre 0.5 y 2 µg, aunque con 10 pg todavía se evidenció dicha banda y en cambio ya no se visualizó con 10 µg (Figura 6).



Figura 6. Sensibilidad del PCR en el ADN extraído de una biopsia con cultivo positivo a *M. tb*

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml de agua. En las líneas: 1, 14) Controles de reactivos, 2) 10 µg, 3) 5 µg, 4) 3 µg, 5) 2 µg, 6) 1 µg, 7) 0,5 µg, 8) 0.1 µg, 9) 10 ng, 10) 1 ng, 11) 100 pg, 12) 10 pg, 13) *M. tb* ATCC 103C, 15) Marcador de Kpb.

#### 7.4. ESTUDIO CONTROLADO Y CIEGO

Con las condiciones de PCR estandarizadas en el experimento anterior la amplificación del producto de 123 pb se observó en todas las 11 biopsias con cultivo positivo para *M. tb* o *M. bovis* así: 5 biopsias de pulmón y 3 de ganglio positivos para *M. tb* y 3 de ganglio linfático positivos para *M. bovis*. No se detectó en ninguna de las 30 biopsias sin TB; estas fueron: una biopsia hepática con *Candida* spp, una con *Cryptococcus* spp, una con *Histoplasma* spp, una con *M. xenopi*, 3 de hígado y una de pulmón con

***M. avium-Intracellulare***, 3 con cirrosis , 2 con cirrosis biliar primaria, una con fibrosis portal, 1 con colestasis, 2 con hepatitis crónica, una con hepatitis viral aguda, 3 con linfoma, 3 con esteatosis , 2 con carcinoma metastásico y 4 hígados normales. La sensibilidad y especificidad obtenidas en este estudio son del 100% (Figura 7).

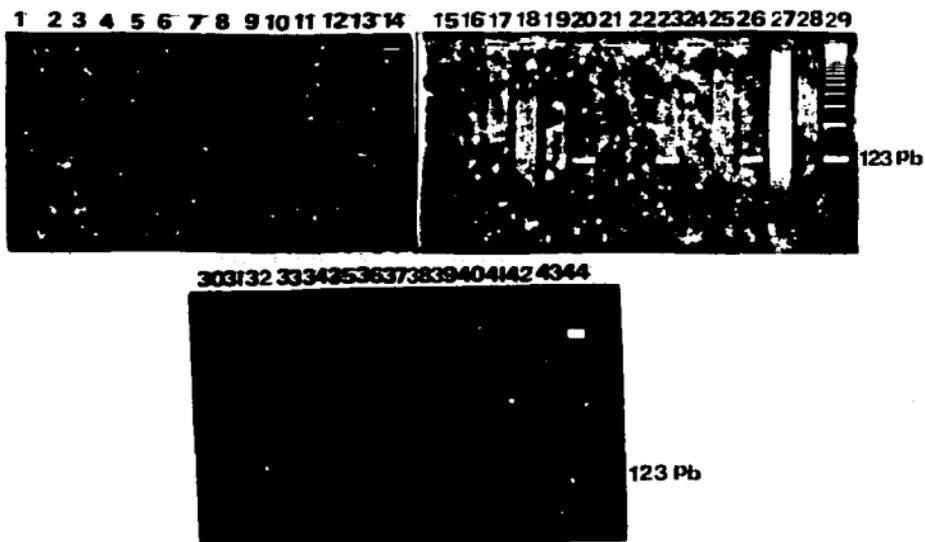


Figura 7. Estudio ciego de biopsias con y sin TB.

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml de agua. En las líneas: 1,13,15 y 30) Controles de reactivos; 2, 19 y 27) Esteatosis hepáticas; 3,11 y 25) Hígados normales; 4 y 28) Linfomas hepáticos, 5 y 16) Cirrosis biliar primarias, 6) Carcinoma metastásico; 7,8,10,20 y 31) Pulmones con *M. tb*; 9,23,26 y 37) Ganglios con *M. tb*; 12 y 43) Control positivo ADN de *M. tb ATCC 103C*; 14,29 y 44) Marcadores de Kpb; 17) Cirrosis hepática, 18) Colestasis; 21) Sin muestra; 22 y 24) Hepatitis crónica; 32) Hígado con *M. xenopi*, 33 y 36) Hígados con *M. avium-Intracellulare*, 34) Hígado con *Candida* spp; 35) Pulmón con *M. avium-Intracellulare*; 38,39 y 40) Ganglios con *M. bovis*, 41) Hígado con *Cryptococcus* spp 42) Hígado con *Histoplasma* spp.

## 7.5. HEPATITIS GRANULOMATOSA

En los archivos de patología se encontraron 144 HG diagnosticadas entre el 1o de enero de 1987 y el 31 de diciembre de 1991 de las cuales 80 el (55,5%) que fué posible disponer de tejido suficiente se procesaron para PCR. De estas, 49 (61.2%) de los expedientes fueron evaluables de acuerdo con las definiciones, así:

HG tuberculosa: ningún caso.

HG probablemente tuberculosa: Fueron 9 casos, 2 de ellos con cultivo positivo a *M. tb* en otro sitio diferente al hígado, uno en un ganglio cervical y la orina y el otro en un hemocultivo.

HG posiblemente tuberculosa: Fueron 5 casos.

HG con BAAR en el hígado u otro sitio: Fueron 9 casos, 2 con la tinción positiva en otro sitio (uno en el bazo y el otro en un lavado bronquial y en un ganglio linfático).

HG con micobacterias no TB en el hígado u otro sitio: Se encontraron 7 casos. De estos 5 con aislamientos en el hígado (una *M. kansasii*, una *M. fortuitum*, una *M. leprae* y 2 *Mycobacterium* spp no TB) y 2 casos con aislamiento en otro sitio (uno con *M. kansasii* en la orina y el otro con *M. szulgai* en la médula ósea).

HG de etiología no tuberculosa: Fueron 19 casos.

HG de etiología no clasificable: En este grupo se encontraron 31 casos.

Los resultados de la prueba de PCR se muestran en la tabla 4 y la figura 8

**Tabla 4. Resultados de PCR para identificar M.tb en hepatitis granulomatosa**

CATEGORIAS	PCR POSITIVO		PCR NEGATIVO		TOTAL
	HIV POSITIVO	HIV NEGATIVO	HIV POSITIVO	HIV NEGATIVO	
HG tuberculosa	0	0	0	0	0
HG probablemente TB	1	5	2*	1	9
HG posiblemente TB	0	2	0	3	5
HG con BAAR en el hígado u otro sitio	1**	1	6*	1	9
HG y M. no TB en hígado u otro sitio	1	0	4**	2	7
HG no TB	0	0	4	15	19
HG de etiología no clasificable	5	4	15	7	31
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>31</b>	<b>29</b>	<b>80</b>

- Cultivo positivo a M.tb en otro sitio no hígado, una en hemocultivo y la otra en ganglio cervical y orina
- \*\* En el bazo
- Una en lavado bronquial y ganglio linfático
- \*\* 2 en otro sitio diferente al hígado, una en la médula ósea y la otra en la orina

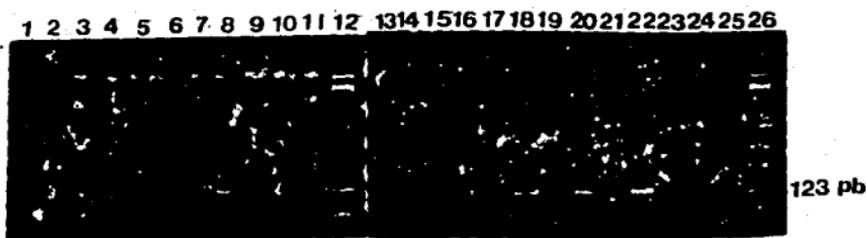


Figura 8. **Resultados de PCR en hepatitis granulomatosa**

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a concentración de 0.001 mg/ml de agua. En las líneas: 1 y 25) Control de reactivos; 2,7 y 14) HG posiblemente TB; 3,11 y 19) HG probablemente TB; 4,5,6) HG con *Mycobacterium* spp en el hígado; 8,15 y 21) Tejidos no evaluables; 9) HG con *Histoplasma* spp; 10,17 y 18) HG no evaluables; 12 y 26) Marcadores de Kpb; 13 y 16) HG asociada a linfoma; 20) HG con *Mycobacterium* spp en otro sitio diferente al hígado, 22) Biopsia control positivo ganglio con *M. tb*, 23) Biopsia control negativo esteatosis hepática, 24) Control positivo ADN *M. tb* ATCC 103C.

De los 9 casos con HG probablemente tuberculosa 6 fueron PCR positivos, de estos sólo un caso era HIV positivo. De los 3 casos PCR negativos 2 tenían cultivo positivo a *M. tb* uno en un ganglio cervical y en la orina y el otro en un hemocultivo, ambos pacientes eran HIV positivos.

De los 5 casos de HG posiblemente tuberculosa 2 fueron PCR positivos y 3 PCR negativos, todos HIV negativos.

De los 9 casos de HG con BAAR en el hígado u otro sitio, 7 eran HIV positivos y 2 HIV negativos. De los 9 casos sólo 2 fueron PCR positivos, uno de ellos HIV positivo, con BAAR en el bazo y el otro HIV negativo con BAAR en el hígado. De los 7 PCR negativos 5 fueron tinción positiva en el hígado.

De los 7 casos de HG con micobacterias no tuberculosas en el hígado u otro sitio, uno fue PCR positivo y el resto PCR negativos. El caso PCR positivo correspondía a un paciente con SIDA y cultivo positivo a *M. kansasii* en el hígado, la expectoración y los hemocultivos y además cultivo positivo a *M. avium-intracellulare* en la médula ósea. Los casos negativos para PCR fueron causados por una *M. leprae*, una *M. fortuitum* y 2 *Mycobacterium* spp no TB en el hígado y los otros 2 PCR negativos fueron HG asociadas a aislamiento de *M. kansasii* en la orina y *M. szulgai* en la médula ósea respectivamente. De los 6 casos PCR negativos en este grupo 4 eran HIV positivos y 2 HIV negativos.

Los 19 casos de HG no tuberculosa fueron todos PCR negativo.

De los 31 casos de HG de etiología no clasificable, 9 fueron PCR positivos.

La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) calculados para la HG probablemente tuberculosa (9 casos), contra la HG asociada a micobacterias no TB más la HG no tuberculosa (26 casos), se presenta en la tabla 5.

**Tabla 5. Detección de M.tb mediante PCR en HG probablemente tuberculosa**

GRUPO A PREDECIR	GRUPO CONTRASTE	S	E	V.P.P.	V.P.N.
HG por TB probable	HG con M. no TB en el hígado y/u otro sitio + HG no TB	66.6%	96.1%	85.7%	89.3%
n = 9	n = 26	(36,96)	(88,100)	(59,100)	(77,100)

Las cifras entre los paréntesis corresponden al intervalo de confianza 95%

La S fué del 66.6%, con un intervalo de confianza IC 95% de (36,96%), la E fué del 96.1% con IC 95% (88,100%), el VPP es de 85.7% con IC 95% (59,100%) y el VPN de 89.3% con IC 95% (77-100%).

Entre las HG probable y posiblemente causadas por TB la tinción de ZN no diagnosticó ningún caso, el cultivo diagnosticó 2 casos 14.3% y el PCR 8 casos 57.1%, además el PCR fué positivo en otros dos casos con ZN positivo y cultivo negativo y 9 de los casos no evaluables (Tabla 6).

**Tabla 6. Utilidad del cultivo, Ziehl Neelsen y el PCR para diagnóstico de HG probable y posiblemente tuberculosa**

CATEGORIA	n	CULTIVO POSITIVO	ZN POSITIVO	PCR POSITIVO
TB probable	9	2 (22)	0 (0)	6 (67)
TB posible	5	0 (0)	0 (0)	2 (40)
TOTAL	14	2 (14)	0 (0)	8 (57)

Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes

La frecuencia de PCR positivo en HG en general en pacientes con infección por HIV, (39 casos) fué del 20.5%, mientras que en pacientes sin infección por HIV (41 casos) fué del 29% y cuando se considera sólo la HG asociada a micobacterias la frecuencia de PCR positivo en pacientes HIV positivos (15 casos), fué del 20% mientras que en pacientes HIV negativos (15 casos) fué del 53.3%, estas diferencias no fueron significativas.

## 8. DISCUSION

La TB es uno de los más importantes problemas de Salud Pública.

A partir de 1985 con la epidemia del SIDA la tasa de TB empezó a incrementarse observándose un mayor número de casos a los esperados en los EUA desde 1985 en adelante (89).

Una de las prioridades es encontrar un método de diagnóstico rápido y efectivo que supere las limitaciones de sensibilidad y especificidad de la tinción, el PPD, los métodos serológicos y el cultivo. En este estudio se estandarizó una prueba de PCR para identificar *M. tb* en los tejidos previamente fijados en formaldehído y embebidos en parafina y se evaluó su utilidad en el diagnóstico de la etiología tuberculosa en biopsias con hepatitis granulomatosa.

La capacidad de la prueba para detectar las cantidades mínimas utilizadas de ADN de *M. tb* que fué de 10 fg, en las condiciones de PCR establecidas y con 45 ciclos es comparable a la encontrada por Eisenach y col. (50) quienes detectaron 100 fg con más de 25 ciclos y 1 fg (genoma de una micobacteria) con más de 30 ciclos, aunque su número de ciclos fué inferior, la detección del producto de PCR fué realizada mediante hibridación con un oligonucleótido iniciador marcado con <sup>32</sup>P, método que en varios estudios (23,44,67,68), ha demostrado mejor sensibilidad que la detección mediante la tinción con bromuro de etidio en el gel de agarosa. Esta sensibilidad del PCR en el presente estudio fué mejor que la obtenida con los iniciadores para amplificar fragmentos del gene *Gro EL* y secuencias de ADN procedentes de la clona lambda PH7311. Hance y col.(44) con los iniciadores TB1 y TB2 y 40 ciclos detectaron cantidades de ADN correspondiente a sólo más de 1000 micobacterias cuando el producto se visualizó mediante tinción con el bromuro de etidio y entre 3 y 100 micobacterias cuando hibridaron con una sonda marcada con <sup>32</sup>P. Hemans y col. (49) con los iniciadores para amplificar un fragmento incluido en el ADN de la clona lambda PH7311 y 30 a 40 ciclos

detectaron 100 fg de ADN (100 micobacterias) hibridando con una sonda marcada con digoxigenina.

Durante el desarrollo de este estudio se ensayaron los iniciadores ya utilizados por Shankar y col.(69,70,71) para amplificar un fragmento de 240 pb del gene para la proteina MPB64 observándose una detección de 1 µg como cantidad mínima de ADN de *M. tb* ATCC 103C y de 1 µg como cantidad mínima de ADN de una biopsia con cultivo positivo a *M. tb*. Estos datos no son mostrados pero revelan una menor sensibilidad de estos iniciadores para identificar *M. tb*.

La sensibilidad y especificidad del método de 100% para la identificación de micobacterias del complejo *M. tb* obtenidas en los ensayos con ADN de micobacterias, otros microorganismos procedentes de cultivos y el ADN de los linfocitos humanos, confirman los hallazgos ya obtenidos por Eisenach y col. (50,75,76) Estos autores han encontrado esta secuencia de inserción mediante estudios de hibridación con el genoma de *M. tb* tratado con enzimas de restricción, y el fragmento de 123 pb mediante PCR en las micobacterias del complejo *M. tb*, sin embargo el fragmento de 123 pb se pudo visualizar en el ADN de *M. simiae* (50) y un fragmento de 263 pb de la misma secuencia de inserción se visualizó débilmente mediante PCR en el ADN extraído de *M. terrae* (77). Aunque estas micobacterias no fueron probadas en el presente estudio, su importancia en el diagnóstico clínico es mínima dada la casi nula relación de ellas con enfermedad.

La técnica utilizada para procesar las biopsias previamente fijadas en formaldehído y embebidas en parafina permite obtener un ADN de una calidad y cantidad adecuadas para su amplificación con el método de PCR. Por otra parte esta técnica permite reducir el tiempo del diagnóstico de la infección causada por micobacterias del complejo *M. tb*, de 5 a 11 semanas que requiere el crecimiento en cultivo y la identificación (21) a máximo 2 días. Este tiempo podría aún ser disminuido al procesar material fresco no embebido en parafina que no requiere de desparafinación.

No se ha informado un estudio de PCR para diagnóstico de TB en biopsias y en los trabajos realizados con muestras clínicas, predominantemente se estudian expectoraciones y líquidos como lavados broncoalveolares, líquidos cefalorraquídeos y pleurales, en algunos de ellos se han incluido reducido número de tejidos, y no se informan datos sobre el rendimiento del ADN obtenido de cada biopsia y la cantidad de ADN total de la biopsia requerida para que el producto sea detectable. Con este método de extracción de ADN el rendimiento dependió de la cantidad de tejido sometido al procedimiento siendo de 2,5 a 88 µg en las biopsias utilizadas para el estudio ciego y 500 ng la cantidad mínima obtenida de las biopsias con HG, dicha cantidad fué suficiente, ya que la amplificación ocurrió hasta con 10 pg de ADN total.

La sensibilidad de 100% para detectar las biopsias con cultivo positivo a *M. tb* demuestra que el procedimiento de extracción aplicado en las biopsias es óptimo para la obtención de secuencias de ADN de las micobacterias susceptibles de amplificarse y a pesar de que la fijación del tejido se llevó a cabo con formaldehído preparado sin soluciones amortiguadoras. Esta experiencia es diferente a la informada por de Wit y col. (90) quienes al utilizar muestras fijadas en formalina amortiguada, fijadas en formalina con mercurio y formalina en solución salina no amortiguada encontraron una disminución de la sensibilidad para detectar *M. leprae* en las biopsias fijadas en formalina con mercurio o en formalina no amortiguada. Sin embargo en el presente estudio fué necesario aumentar el número de ciclos del PCR para las muestras procedentes de las biopsias y no se puede descartar que este no sea un efecto de la fijación con formalina no neutralizada y que pudiera afectar la sensibilidad de la prueba para identificar ADN de las micobacterias en muestras con muy escaso número de ellas.

Al comparar las biopsias con cultivo positivo a *M. tb* contra las biopsias con infección por micobacterias no TB, hongos y otras patologías no infecciosas se demuestra que la prueba tiene una sensibilidad y especificidad del 100% evidenciando que además del ADN de los otros microorganismos no TB, el ADN procedente de las células hepáticas, pulmonares, y de ganglio linfático no cruza con la secuencia del fragmento de 123 pb de

IS6110. Estos hallazgos sugieren también que en estos tejidos y con el procedimiento de purificación y precipitación del ADN extraído, no se presentan inhibidores de la enzima taq polimerasa. aún cuando estos no se buscaron en todas las muestras negativas, se hizo un experimento con una biopsia sometida al mismo procedimiento de extracción, amplificandola con y sin la adición de ADN de micobacterias. Esta biopsia fué positiva por PCR para un fragmento de 240 pb del gene para la proteína MPB64 del complejo *M. tb* sólo cuando se le adicionó el ADN de micobacterias (dato no mostrado). Este hallazgo demuestra que en este tipo de muestras y con el procedimiento usado no existieron inhibidores de la taq polimerasa. La presencia de ellos se ha informado principalmente en muestras frescas y especialmente en heces, aunque también en el estudio de biopsias de piel para buscar *M. leprae*, de wit y col. (90) propusieron la presencia de los inhibidores en las muestras sin diluir. El procedimiento utilizado por los autores para extraer el ADN en estas biopsias no incluyó tratamiento con cloroformo-alcohol isoamílico ni precipitación del ADN con etanol que permiten purificar mejor los ácidos nucleicos, en cambio el fragmento de tejido digerido con proteínaasa K durante 18 horas e incubado a 97°C durante 15 minutos fué procesado directamente para PCR.

La sensibilidad de la técnica de PCR cuando es aplicada en muestras clínicas con cultivo positivo a *M. tb*, ha sido del 100% utilizando iniciadores para fragmentos del gene *GroEL* (63,65), fragmentos del gene para las proteínas MPB64 (69,71) y *mtp40* (23) y fragmentos de la clona de 5.5 Kpb Mbol (73). Eisenach y col. encontraron una sensibilidad del 98% con los mismos iniciadores utilizados en este estudio para amplificar un fragmento IS6110 (76) y Savic 95% con ISL1 e ISL2 para otro fragmento también de IS6110 (77) y una sensibilidad del 97% con iniciadores para un fragmento del gene para la proteína MPB70 (72). La sensibilidad del 100% obtenida en nuestro estudio en el ADN de las biopsias con cultivo positivo a *M. tb*, es muy similar a las cifras anteriores y quizás ligeramente mejor que la mostrada por experiencias de PCR para fragmentos de esta misma secuencia de inserción sugiriendo que en tejidos con cultivo positivo la prueba puede ser tan sensible como en los líquidos con el cultivo positivo.

Por otra parte, cuando la técnica se valora en base al diagnóstico clínico de TB en muestras de diferentes líquidos ( expectoración, lavados bronquiales, broncoalveolares, cefalorraquídeos, pleurales) con o sin cultivos positivos la sensibilidad de la prueba de PCR ha variado desde el 26.5% en la informada por Manjunath y col. (71) utilizando iniciadores para amplificar un fragmento de 240 pb del gene de la proteína MPB64 en 117 muestras de las cuales 14.5% tenían cultivo positivo, al 61% encontrada por Saboor y col.(68) con iniciadores para el gene *Gro EL* y los iniciadores Bx1 y Bx2 para un fragmento de la IS6110 y 80 % de sensibilidad encontrada por Brisson-Noel y col. (66) con los iniciadores TB1 y TB2 para un fragmento del gene *Gro EL* y los iniciadores ISTB1 e ISTB7 para un fragmento de IS6110.

El analisis de los resultados de la aplicación de la prueba de PCR en HG tiene limitaciones importantes, ya que por la baja sensibilidad del cultivo en este tipo de lesiones extrapulmonares, del 0 al 10%, fué necesario establecer criterios clínicos y de respuesta al tratamiento para definir la probabilidad o posibilidad de TB y comparar con ellos, los resultados del PCR. Así, al comparar el grupo de HG probablemente tuberculosa (9 casos) contra el grupo de HG asociada a micobacterias no TB, otras infecciones no TB y otras patologías no infecciosas (26 casos), la sensibilidad dada por el PCR del 66.6% con un valor predictivo positivo del 85.7%, fué mejor que la obtenida en los trabajos mencionados previamente, los cuales incluyeron muestras tanto con cultivo positivo como negativo. Dos de los casos de HG probablemente tuberculosa en quienes el PCR fué negativo en las biopsias de hígado pero *M. tb* se cultivó en otros sitios, eran pacientes con SIDA y por consecuencia no se puede descartar que la reacción granulomatosa que ocurre en el hígado de este tipo de pacientes se deba a otros agentes etiológicos como otras micobacterias no TB, hongos, etc.

La especificidad del 96.1% con un valor predictivo negativo del 85.7% es comparable a la encontrada por los estudios en las muestras clínicas mencionadas anteriormente. Por otro lado cabe mencionar que el único caso falso positivo ocurrió con la biopsia de un paciente Mexicano con SIDA y alto riesgo para padecer enfermedad por *M. tb*. La

micobacteria aislada del hígado de este paciente aún no ha sido posible clasificarla, quedando provisionalmente como *M. kansasii*, sin que se haya descartado completamente la posibilidad de que sea *M. bovis* y por consecuencia podría no ser una falsa positiva. La otra alternativa que puede explicar este falso positivo es que el paciente cursara con una infección múltiple incluyendo *M. tb* y la otra posibilidad es la contaminación cruzada entre las muestras con micobacterias o ADN de ellas, en algún momento de su procesamiento. El ADN de varias cepas de *M. kansasii* ha sido probado para la IS6110 y para el fragmento de 123 pb de esta secuencia en el estudio de Eisenach y col. (50) quienes no encontraron ni la secuencia IS6110 mediante tratamiento del ADN con enzimas de restricción e hibridación ni el fragmento de 123 pb mediante PCR. Por otra parte en el presente estudio el ADN extraído del cultivo de *M. kansasii* y la biopsia con HG asociada a aislamiento de *M. kansasii* en la orina dieron la prueba de PCR negativo, siendo estos hechos, una fuerte evidencia de que esta micobacteria no resulta en falsos positivos con estos iniciadores.

Al analizar la Tabla 7 donde se comparan las etiologías de la HG informadas por otros autores con las obtenidas en el "INNSZ" en el presente estudio considerando que a los métodos diagnósticos de los anteriores estudios se sumó el PCR, se puede deducir que las micobacterias siguen siendo los microorganismos más frecuentemente causantes de HG 48% en este estudio, cuando se emplean como métodos de diagnóstico la clínica y la respuesta al tratamiento, la tinción, el cultivo y el PCR, 31% *M. tb* y 17% micobacterias no TB, estas últimas especialmente en pacientes HIV positivos, sugiriendo que en próximos estudios deben incluirse iniciadores que detecten secuencias de micobacterias no TB. El estudio permite concluir que es posible utilizar tejidos para pruebas de PCR con el fin de diagnosticar TB con una sensibilidad mejor que el cultivo y la tinción, con ganancia de tiempo en el tratamiento de los pacientes con HG y probablemente con aplicación al diagnóstico de TB extrapulmonar que es el grupo que ofrece mayor dificultad en este aspecto.

**Tabla 7. Causas de la hepatitis granulomatosa diagnosticadas en biopsias hepáticas.**

ETIOLOGIA	Guckian	Cunningham INNSZ	
	1966 (2)	1982 (11)	1993
Sarcoidosis	12	10	0
Tuberculosis	11	10	31+
Otras micobacterias	0	0	17+
Neoplasias	5*	8	10*
Micosis	5	0	4
Bacteriana	0	6	0
Parasitaria	1	1	1
Otras no infecciosas	0	32	8
No determinada	20	31	29

+ Diagnóstico mediante tinción, cultivo, clínica y PCR

\* Linfomas

## 9. BIBLIOGRAFIA

- 1 Edmonson, H.A. Needle biopsy in differential diagnosis of acute liver disease. J.A.M.A. 1965; 191: 480-486.
- 2 Guckian, J.G.; Perry, J.E. Granulomatous hepatitis: Analysis of 63 cases and review of the literature. Ann. Intern Med 1966; 65: 1081-1100.
- 3 Satti, M.B.; Al-Freihi, H.; Imbrahim, E.M.; Abu-Melha, A.; Facharzt, A.A.; Facharzt, G.A.; Facharzt, H.Y.A.; Al-Sobhaibani, M.O. Hepatic granuloma in Saudi Arabia: A clinicopathological study of 59 cases. Am J. Gastroenterol 1990; 85: 669-73.
- 4 Wagoner, G.P.; Anton, A.T.; Gall, E.A.; Schiff, L. Needle biopsy of the liver. VIII. Experiences with hepatic granulomas. Gastroenterology 1953; 25: 487-494.
- 5 Bunim, J.J.; Kimberg, D.V.; Thomas, L.B.; van Scott, e.J.; Klatskin G., The syndrome of sarcoidosis, psoriasis and gout. Ann. Intern Med 1962; 57: 1018-1040.
- 6 Terplan, M. Hepatic granulomas of unknown cause presenting with fever. Am J. gastroenterol 1971; 55: 43-49.
- 7 Mir-Madjlessi, S.H.; Farmer, R.G.; Hawk, W.A. Granulomatous hepatitis: A review of 50 cases. Am J. Gastroenterol 1973; 60: 122-134.
- 8 Fauci, A.S.; Wolf, S.M. Granulomatous hepatitis. Prog. Liver Dis. 1976; 5: 609-621.
- 9 Hughes, M.; Fox, H. A histological analysis of granulomatous hepatitis. J. Clin. Pathol. 1972; 25: 817-820.

- 10 Klatsking, G. Hepatic granulomata: Problems in interpretation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1976; 278: 427-432.
- 11 Cunningham D.; Mills, P.R.; Quigley, E.M.M.; Patrick, R. S.; Watkinson, G.; McKenzie, J. F.; Russell R.I. Hepatic granulomas: Experience over a 10-year period in the west of Scotland. *Q. J. Med.* 1982; New series LI: 162-170.
- 12 Neville, E.; Piyasena, K.H.G. James, D.G. Granulomas of the liver. *Postgrad. Med. J.* 1975; 51: 361-365.
- 13 Korn, R.J.; Kellow, W.F.; Heller, P.; Chomet, B.; Zimmerman, H.J. Hepatic involvement extrapulmonary tuberculosis-histologic and functional characteristics. *Am. J. Med.* 1959; 27: 60.
- 14 Slavin, R.E.; Walsh, T.J.; Pollack, A.D. Late generalized tuberculosis: A clinical Pathologic analysis and comparison of 1100 cases in the preantibiotic and antibiotics eras. *Medicine* 1980; 59: 352-366.
- 15 Bowry, S.; Chan, C. H.; Weiss, H.; Katz, S.; Zimmerman, H.J. Hepatic involvement in pulmonary tuberculosis. Histologic and functional characteristics. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1970; 101: 941-948.
- 16 Fitzgerald, M.X.; Fitzgrald, O.; Towers, R.P. Granulomatous hepatitis of obscure aetiology. Diagnostic contribution of Kveim testing and antituberculous therapy. *Q. J. Med.* 1971; 40: 371-383.
- 17 Simon, H.B.; Wolff, S.M. Granulomatous hepatitis and prolonged fever of unknown origin: A study of 13 patients. *Medicine* 1973; 52: 1-21.

- 18 Simon, H.B.; Wolff, S.M. Sarcoidosis and hepatic granulomatous (letter). *Ann. Intern med* 1974; 80: 560-561.
- 19 Roberts, M.C.; McMillan, C.H.; Coyle, M.B. Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 1239-1243.
- 20 Drake, T.A.; Hindler, O.; Berling, G.W.; Bruckner, D.A. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25: 1442.
- 21 Ellner, P.D.; Kiehn, T. E.; Cammarata, R.; Hosmer, M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1349-1352.
- 22 Musial, E.; Tice, L.S.; Sockman, L.; Roberts, G.D. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 2120-2123.
- 23 Del Portillo, P.; Murillo, L.A.; Patarroyo, M.E. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* it's possible use in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2163-
- 24 Goelz, S.E.; Hamilton, S.R; Vogelstein, B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985; 130: 118-126.
- 25 Impraim, Ch.C.; Saiki, R.K.; Erlich, H.A.; Teplitz, R.L. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and

- hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 142: 710-716.
- 26 Shibata, D.; Martin, W.J.; Arnheim, N. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: A bridge between molecular biology and classical histology. *Can. Res.* 1988; 48: 4564.
- 27 Shibata, D.K.; Arnheim, N.; Martin, W.J. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 225-230
- 28 Wright, D.K. and Manos, M.M. 1990. Sample preparation from paraffin embedded tissues, p. 153-158. En Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Snisky, J.J.; White, T.J. (ed.) PCR protocols: A guide to methods and application, Academic Press Inc, San Diego, Ca.
- 29 Styblo, K. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries *Rev. Infect. Dis.* 1989; (suppl 2): s339-s346.
- 30 Harrington, P.T.; Gutierrez, J.J.; Ramirez R., C.H.; Quiñonez, S.R.; Bermudez, R.H.; Chaffey, J. Granulomatous hepatitis. *Rev. Infect. Dis.* 1982; 4: 638-654.
- 31 Cotran, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L. 1989. Inflammation and repair p.39-86. Cotran, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L. (ed.) *Pathologic basis of diseases*, W.B. Saunders; Philadelphia, P.A.
- 32 Warren, K. S. A functional classification of granulomatous inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1976; 278: 7-18.

- 33 von Lichtenberg, F. Host response to eggs of *S. mansoni* I. granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. *Am. J. Pathol.* 1962;41: 711-731.
- 34 Warren, K.S.; Domingo, E.O.; Cowan, R.B.T. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* 1967; 51: 735-756.
- 35 Churg, J.; Strauss, L. Allergic granulomatosis, allergic angiitis and periarteritis nodosa. *Am. J. Pathol.* 1951; 27: 277-299.
- 36 Spector, W.G.; Heesom, N. The production of granulomata by antigen-antibody complexes. *J. Pathol.* 1969; 98: 31-39.
- 37 Danieli, R.P.; Dauber, J.H.; Rosman, M.D. Immunologic abnormalities in sarcoidosis. *Ann. Intern Med* 1980; 92: 406-416.
- 38 Boros, D.L.; Warren, K.S. The bentonite granuloma: characterization of a model system for infectious and foreign body granulomatosis using soluble mycobacterial, histoplasma and schistosoma antigens. *Immunology* 1973; 24: 511-529.
- 39 Spector, W.G. The granulomatous inflammatory exudate. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1969; 8: 1-55.
- 40 Anonymous. Granulomas of the liver ( editorial) *Lancet* 1975; II: 1079-1080.
- 41 Simon, H.B.; Wolff, S.M. Granulomatous hepatitis and prolonged fever of unknown origin: a study of 13 patients. *Medicine* 1973; 52: 1-21.
- 42 Fitzgerald, M.X.; Fitzgerald, O.; Towers, R. P. Granulomatous hepatitis of obscure

- aetiology. Diagnostic contribution of Kveim testing and anti-tuberculous therapy. *Q. J. Med.* 1971; 40: 371-383.
- 43 Shinnick, T.M. The 65-Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 1987; 169: 1080-1088.
- 44 Hance, A.J.; Grandchamp, B.; Frébault, V.L.; Lecossier, D.; Rauzier, J; Bocart, D.; Gicquel, B. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Molec. Microbiol.* 1988; 3: 843-849.
- 45 Hartskeerl, R.A.; de Wit, M.Y.; Klatser, P.R. Polymerase chain reaction for detection of *M. leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135: 2357-2364.
- 46 Begard, A.A.; Hansen, E.B. Structure and mapping of antigen do,mains of protein antigen b a 38.000 molecular wieght protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1989; 57: 2481-2488.
- 47 Parra, C.A.; Londoño, L.P.; Del Portillo, P.; Patarroyo, M. Isolation, characterization, and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: Identification of a species-specific sequence. *Infect. Immun.* 1991; 59: 3411-3417.
- 48 Thierry, D.; Cave, M.D.; Eisenach, K.D.; Crawford, J.T.; Bates, J.H.; Gicquel, B.; Guesdon, J.L. IS6110 an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic. Acids. Res.* 1990; 18: 188.
- 49 Hermans, P.W.M.; Schuitema, A.R.J.; Soolingen, D.V.; Verstyne, C.P.H.J.; Bik, E.M.; Thole, J.E.R.; Kolk, A.H.J. and et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1203-1213.

- 50 Eisenach, K.D.; Cave, M.D.; Bates, J. H.; Crawford, J.T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 1990; 161: 977-981.
- 51 Estrada, G.I.C.E.; Lam, F.I.; Colston, M.J. and Cox, R.A. partial nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA isolated from armadillo grown *Mycobacterium leprae*. J. Gen. Microbiol. 1988; 134: 1449-1453.
- 52 Hoopwood, D.A.; Kieser, T.; and Camb, F.I. Molecular biology of mycobacteria. British Med. Bull. 1988; 44: 528-543.
- 53 Young, R.A.; Bloom, B.R.; Grosskinsky, C.M.; Ivanyi, J.; Thomas, D.; Davis, R.W. Dissection of Mycobacterial tuberculosis antigens using recombinant DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 2583-2587.
- 54 Dannenberg, A.M. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 1982; 125: 25-29
- 55 Gillis, T.P.; Miller, R.A; Young, D.B.; Khanolkar, S.R.; Buchanan, T.M. Immunochemical characterization of a protein associated with *Mycobacterium leprae* cell wall. Infect. Immun. 1985; 49: 371-
- 56 Engers, H.D.; Abe, M.; Bloom, B.R.; Mhra, V.; Britton, W.; Buchanan, T.M.; Ivanyi, J. et al. Results of a World Health Organization-sponsored workshop on monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae* Infect. Immun. 1985; 48: 603-605.
- 57 Engers, H.D.; Houva, V.; Bennedsen, J.; Buchanan, T.M.; Chaparas, S.D.; Kadival, G.; Closs, O. et al. Results of a World Health Organization-sponsored workshop

- to characterize antigens recognized by mycobacteria specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 1986; 51: 718-720.
- 58 Gillis, T.P.; Buchanan, T.M. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 1982; 37: 172-178.
- 59 Emmrich, F.; Thole, J.; van Embden, J.; Kaufmann, S.H.E.A recombinant 65 Kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin specifically stimulates human T4 clones reactive to mycobacterial antigens. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 1024-1029.
- 60 Thole, J.E.R.; Dauwerse, H.G.; Das, P.K.; Grooth, D.G.; Schouls, L.M. and van Embden, J.D.A. Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG DNA and expression of antigen on *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1985; 50: 800-806.
- 61 Athwal, R.S.; Deo, S.S.; Imaeda, T. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium* and selected bacteria by dot blot and spectrophotometric deoxyribonucleic acid hybridization assays. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1985; 34: 371-375.
- 62 Athwal, R.S.; Deo, S.S.; Imaeda, T. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* BCG, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium africanum*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1985; 35: 147-150.
- 63 Brisson-Noel, A.; Gicquel, B.; Lecossier, D.; Levy-Frébault, V.; Nassif, X.; Hance, A.J. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; II : 1069-1071.

- 64 Pao, Ch.C.; Benedict Y, T.S.; You, J.B.; Maa, J.S.; Fiss, E.H.; Chang, Ch.H. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J. Clin. microbiol. 1990; 28: 1877-1880.
- 65 Thierry, D.; Brisson-Noel, A.; Lévy-Frébault, V.V.; Nguyen, S.; Gueston, J.L.; Gicquel; B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and application in diagnosis. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2668-2673.
- 66 Brisson-Noel, A.; Aznar, Ch.; Chureau, C.; Nguyen, S.; Pierre, C.; Bartoli, M.; Bonete, R. et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet 1991; 338: 364-366.
- 67 Pierre, C.; Lecossier, D.; Boussougant, Y.; Bocart, D.; Joly, V.; Yenl, P; Hance, A. J. Use of reamplification protocol improves sensivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 712-712
- 68 Saboor, S.A.; Johnson, N.; McFadden, J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. Lancet 1992; 339: 1012-1015.
- 69 Shankar, P.; Manhunath, N.; Aditi, B.; Seth, P.; Shrinniwas, . Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. Lancet 1990; 335: 423.
- 70 Shankar, P.; Manjunath, N.; Mohan, K.K.; Prasad, K.; Behari, M.; Shriniwas., Ahuja; G.K. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Lancet 1991; 337: 5-7.

- 71 Manhunaht, N.; Shankar, P.; Rajan, L.; Bhargava, A.; Saluja, S.; Shiriniwas. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 1991; 72: 21-7.
- 72 Cousins, D.V.; Wilton, S.D.; Francis, B.R; Gow, B. L. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 255-258
- 73 de Wit, D.; Steyn, L.; Shoemaker, S.; Sogin, M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 2437-2441.
- 74 Green, E.P.; Tizar, M.L.V.; Moss, M.T.; Thompson, J.; Winterbourne, D.J.; McFadden, J.L.; Hermond-Taylor, J. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease Isolated of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic. Acids. Res.* 1989; 17: 9063-9073.
- 75 Eisenach, K.D.; Crawford, J.T.; Bates, J.H. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26; 2240-2245.
- 76 Eisenach, K.D.; Sifford, M.D.; Donald Cave, M.; Bates, J.H; Crawford; J.T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 1160-1163.

- 77 Savic, B.; Sjobring, S.; Alugupalli, S.; Larsson, L.; Miomer, H. evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis, and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. J. Infect. Dis. 1992; 166: 1177-1180.
- 78 Sambrook, J.; Fritsch, E.F; Maniatis, T. 1989. Extraction of plasmid DNA, p. 1.21-1.24. En Sambrook, J.; Fritsch, E.F; Maniatis, T. (ed.) Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 79 Perbal, B. 1988. Phenol extraction of nucleic acids, p. 73-76. En Perbal, B. (ed.) A practical guide to molecular cloning, A Wiley Interscience Publication, New York.
- 80 Boom, R.; Sol, C.G.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Whertheim-van Dillen, P.M.E; van der Noorda, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 495-503.
- 81 Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Schare, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, B.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487- 491.
- 82 Oste, Ch. Polymerase chain reaction. Biotechniques 1988; 6: 162-167
- 83 Innis M.A; Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs, p. 3-12. En Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Snisky, J.J.; White, T.J. (ed.) PCR protocols: A guide to methods and application, Academic Press Inc, San Diego, Ca.
- 84 Erlich, H.A. 1989. Basic methodology, p.1-5. En Erlich, H.A.(ed.) PCR technology: Principles and applications for DNA amplification , Stockton press, New York, NY.

- 85 Levenson, C; Chang, Ch. 1990. Nonisotopically labeled probes and primers, p. 49-112. En Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Snisky, J.J.; White, T.J. (ed.) PCR protocols: A guide to methods and application, Academic Press Inc, San Diego, Ca.
- 86 Landergren, U.; Kaiser, R.; Caskey, C.T; Hood, L.A ligase-mediated gene detection technique. Science 1988; 24: 1070-1080.
- 87 Helmuth, R. 1990. Nonisotopic detection of PCR products, p. 119-128. En Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Snisky, J.J.; White, T.J. (ed.) PCR protocols: A guide to methods and application, Academic Press Inc, San Diego, Ca.
- 88 Sjobring, U.; Møcklenburg, M.; Andersen, A.B; Miorner, H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2200-2204.
- 89 Jereb, J.A.; Kelly, G.D.; Dooley, S.W; Cauthen, G.M.; Snider, D.E. Tuberculosis, morbidity in the United States: Final data, 1990. MMWR 1991; 40 (ss-3): 23-28.
- 90 de Wit, M.Y.L.; Faber, W.R.; Krieg, S.R.; Douglas, J.T.; Lucas, S.B.; Montreewassuwat, N.; Pattyn, S.R. et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 906-910.

10. Anexo No 1

Nombre: \_\_\_\_\_ Reg: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Años. Sexo \_\_\_\_\_ Raza \_\_\_\_\_ Ocupación \_\_\_\_\_

Preferencia sexual \_\_\_\_\_ Procedencia \_\_\_\_\_

Fecha Dx H. granulomatosa \_\_\_\_\_

Dx histológico (Bx Hepática) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Cultivo \_\_\_\_\_

Tinción \_\_\_\_\_

PCR: \_\_\_\_\_ PPD \_\_\_\_\_ fecha \_\_\_\_\_

Lectura \_\_\_\_\_ mm. fecha \_\_\_\_\_

LABORATORIOS AL MOMENTO DEL DIAGNOSTICO DE H.G. PFH: TGO: \_\_\_\_\_

TGP \_\_\_\_\_ FA \_\_\_\_\_ BT \_\_\_\_\_ BD \_\_\_\_\_ BI \_\_\_\_\_ PT: \_\_\_\_\_

Alb \_\_\_\_\_ Glo \_\_\_\_\_ TP \_\_\_\_\_

Hb: \_\_\_\_\_ Hto \_\_\_\_\_ Leuc \_\_\_\_\_ Lin \_\_\_\_\_ % Mon \_\_\_\_\_ % eos \_\_\_\_\_ %

Exámenes serológicos: (Relacionados con Enfermedades Infecciosas)

fecha      clase      resultado

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**TRATAMIENTO ANTIFIMICO:**

Medicamentos

Fecha

---

---

Respuesta clínica a los 2 meses de tratamiento: SI \_\_\_ NO \_\_\_

**LABORATORIOS A 2 MESES DE TRATAMIENTO:**

PCR \_\_\_\_\_ PFH: TGO: \_\_\_\_\_ TGP \_\_\_\_\_

FA \_\_\_\_\_ BT \_\_\_\_\_ BD \_\_\_\_\_ BI \_\_\_\_\_ PT \_\_\_\_\_ Alb \_\_\_\_\_

Glob \_\_\_\_\_ TP \_\_\_\_\_

Hb \_\_\_\_\_ Hto \_\_\_\_\_ Leuc \_\_\_\_\_ Ljn \_\_\_\_\_ % Mon \_\_\_\_\_ % eos \_\_\_\_\_ %

Biopsia hepática de control \_\_\_\_\_

Diagnóstico histológico: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Tinción \_\_\_\_\_

---

Cultivo: \_\_\_\_\_

PCR \_\_\_\_\_

**LABORATORIOS A LOS 6 MESES DE TRATAMIENTO:**

PFH: TGO: \_\_\_\_\_ TGP \_\_\_\_\_ FA \_\_\_\_\_ BT \_\_\_\_\_ BD \_\_\_\_\_ BI \_\_\_\_\_

PT: \_\_\_\_\_ Alb \_\_\_\_\_ Glob \_\_\_\_\_ TP \_\_\_\_\_

Hto \_\_\_\_\_ Leuc \_\_\_\_\_ Lin \_\_\_\_\_ %Mon \_\_\_\_\_ % eos \_\_\_\_\_ %

**OTROS LABORATORIOS:**

Anti-HIV \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_ Factor de riesgo \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_ CD4 \_\_\_\_\_

Otras patologías \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

otros exámenes microbiológicos

Fecha y muestra                      Tinción                      Cultivo

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Rx tórax: fecha: \_\_\_\_\_ Hallazgos: \_\_\_\_\_

Derrame Pleural: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ Calcificación: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Adenopatía Mediastinal: \_\_\_\_\_ Infiltrado: \_\_\_\_\_

Tipo de infiltrado: \_\_\_\_\_ Localización \_\_\_\_\_

**OTRAS RADIOGRAFIAS:**(pertinentes para el diagnóstico de TB) apuntar clase de  
examen, fecha y hallazgo

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Deasapareció**

Sintomas:	SI	NO	Fecha inic.	SI	NO	Sin dat	Fecha
fiebre	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
per.peso Kg	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
sudoración	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Escalofrío	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
hiporexia	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
dolor abd.	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
diarrea	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
cefalea	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
debilidad	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Otros (especificar)	_____						
	_____						
	_____						

**Resumen y observaciones:**