

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

DIVISIÓN DE ORTOPEDIA

Facultad de Medicina

Curso Universitario de Especialización en Ortopedia

Título:

Utilidad Diagnóstica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa in situ detección de la secuencia IS6110 en el Diagnóstico de Tuberculosis Osteoarticular

Tesis profesional

que para obtener título de especialista en ortopedia presenta:

Dra. Georgina Hernández Rodríguez

Tutores:

Dr. Víctor Manuel Escobedo Troncoso

Dra. Diana Elodia Aguilar León

Dra. Eréndira Georgina Estrada Villaseñor

Dr. Saúl Renán León Hernández

México, DF

2007.



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios,

Por permitirme realizar y terminar la especialidad en Ortopedia.

A mis padres y hermanos,

Por ser un estímulo y la base de mi formación tanto médica como de persona.

A José Alberto,

Por ser mi brazo derecho y un apoyo incondicional.

A mis maestros, compañeros y pacientes,

De los cuales siempre aprendí.

ÍNDICE:

Introducción

Planteamiento del problema

Antecedentes

Justificación

Hipótesis y Objetivos

Material y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Anexos 1

Anexos 2

Bibliografía

Palabras claves: Tuberculosis osteoarticular, PCR, PCR *in situ*,
artritis tuberculosa, métodos diagnósticos para Tb.

INTRODUCCIÓN:

La Tuberculosis es considerada por la Organización Mundial de la Salud en 1993 como una emergencia mundial, este aumento se encuentra directamente relacionado con el aumento en el número de pacientes inmunodeprimidos. ⁽¹⁾

Se calcula que aproximadamente 2 billones de personas en el mundo tienen infección latente, 8 millones desarrollan tuberculosis anualmente, de 2 a 3 millones mueren a consecuencia de esta enfermedad.

Aproximadamente de 10 a 11% de los casos de tuberculosis extrapulmonar es osteoarticular, correspondiendo de 1 a 3% de todos los casos de tuberculosis. Se calcula que la prevalencia global de infección osteoarticular latente de tuberculosis es de 19 a 38 millones. ⁽²⁾

El 50% de la tuberculosis osteoarticular se encuentra en columna vertebral, el 15% en grandes articulaciones como cadera y rodilla y de un 5 a 10% en tobillo y muñeca. ⁽³⁾

La evidencia de tuberculosis pulmonar se encuentra presenta en menos del 50% de los pacientes y se ha observado que en la mayoría de los casos de tuberculosis osteoarticular la vía de diseminación es hematógica. ⁽⁴⁾

La artritis tuberculosa es una enfermedad infecciosa crónica y es la causa más común de las artritis granulomatosas⁽³⁾ y su diagnóstico es tardío ya que los métodos convencionales para el aislamiento del microorganismo son lentos y requieren una gran cantidad de microorganismos para realizar el diagnóstico.

El diagnóstico de tuberculosis osteoarticular es frecuentemente olvidado o retrasado por varios meses con un promedio de 16 a 19 meses.⁽⁴⁾

El diagnóstico definitivo depende del aislamiento del M. tuberculosis a partir de cultivos o identificación del microorganismo por medio de sondas de ADN.⁽⁵⁾

Por lo tanto el diagnóstico suele basarse en: Historia clínica, radiografías, PPD, exámenes de secreciones, estudio histopatológico, cultivos, ELISA y PCR.⁽⁶⁾

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica basada en la ampliación genómica en este caso del M. tuberculosis para llegar a un diagnóstico rápido. Es de particular importancia para el diagnóstico de tuberculosis paucibacilares y extrapulmonar ya que permite la identificación sencilla, rápida y específica de las micobacterias con límite inferior de 1-100 por ml de muestra.⁽⁷⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Por todo lo anterior, observando el retraso en cuanto al diagnóstico de la tuberculosis osteoarticular y debido a que ésta cada vez va en aumento, en el presente protocolo de investigación nos planteamos la pregunta:

¿Cuál es la utilidad diagnóstica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en comparación con el Diagnóstico clínico, patológico y la técnica Ziehl-Neelsen en Tuberculosis osteoarticular?

Tomamos la técnica Ziehl-Neelsen ya que es una prueba de diagnóstico rutinario y puede ser realizado en el Instituto Nacional de Rehabilitación así como en cualquier otro centro hospitalario para llegar al diagnóstico de la tuberculosis osteoarticular.

ANTECEDENTES

Tuberculosis:

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad. Una de las pruebas más antiguas son las lesiones de mal de Pott dorsal que se encuentran presentes en un esqueleto encontrado por Barthel (1907) cerca de Heidelberg, que data de unos 5mil años antes de Cristo.

Robert Koch en 1881 planteaba la posibilidad de inocular cobayos con bacilos donde observa una curación parcial y posteriormente la formación de un nódulo que permanecía hasta la muerte del animal. El bacilo ya podía cultivarse debido al descubrimiento de Lowestein Jensen. En Berlín en 1882 Koch anunció el descubrimiento del bacilo de la tuberculosis, posteriormente denominado *Micobacterium tuberculosis*. En 1905 se hizo merecedor al premio Nóbel de medicina.⁽¹⁾

Los características del *M. tuberculosis* son: bacteria ácida-alcohol resistente, levemente Gram+, no esporulada e inmóvil.

La tuberculosis es una infección crónica que cuenta con una historia natural consistente en primoinfección en la cual la mayoría de los pacientes

Métodos Diagnósticos:

El diagnóstico de la tuberculosis es esencialmente microbiológico y es uno de los pilares en el control, en conjunto con la búsqueda activa de casos y el tratamiento directamente supervisado.

Es crucial e indispensable para el control de la tuberculosis proporcionar resultados tan rápidos y precisos como sea posible ⁽⁵⁾.

La importancia de los métodos diagnósticos en la instauración temprana del tratamiento permitiendo la pronta institución de terapia antituberculosa y así prevenir el daño articular irreversible ya que es potencialmente curable ⁽²⁾.

1. Historia clínica: Se debe considerar la presencia de antecedentes sugestivos haciendo hincapié en contactos con enfermos (Combe), además de contar con un cuadro clínico compatible con la enfermedad, siendo frecuente encontrar fiebre de origen desconocido.
2. Radiografías: Torácicas y de la articulación afectada tratando de encontrar lesiones compatibles con tuberculosis. En tuberculosis articular se puede encontrar la triada de Pheemister⁽⁴⁾ : Osteoporosis yuxtaarticular, erosiones óseas de localización periférica y estrechamiento gradual del espacio interóseo.

3. PPD (Derivado Protein Purificado): Es una intradermorreacción que consiste en aplicar 0.1ml con 5U de tuberculina, se obtiene resultado posterior a 48hrs. Entre mayor reacción mayor probabilidad de infección por *M. tuberculosis*. Una prueba negativa NO descarta la probabilidad de Tuberculosis debido a la linfopenia o inmunosupresión que el paciente puede mostrar.
4. Examen de secreciones (BAAR): Tinción para bacilos ácido alcohol resistentes que sirve para la observación directa del bacilo y se realiza en esputo, orina y ocasionalmente en otras secreciones corporales.
5. Estudio histopatológico: Biopsia a la cual se realizan múltiples tinciones como hematoxilina-eosina (HE), Ziehl-Neelsen y auramina-O y rodamina. La **tinción de Ziehl-Neelsen** es una de las pruebas tradicionales y de escrutinio en el diagnóstico de Tuberculosis donde se observan la presencia de bacilos ácido alcohol resistente. Neggi, Khan y colaboradores en el 2005 ⁽⁸⁾ reportaron una sensibilidad de 33.79% y una especificidad de 100% en comparación de los medios de cultivo LJ, BACTEC y la PCR para el diagnostico de *M. tuberculosis*.
6. Cultivos: El medio mas usado es el Löwenstein Jensen pero su mayor inconveniente es el tiempo que tarda el desarrollo de colonias oscilando de 4 a 8 semanas. Otros medios de cultivo son el Bactec, Middle bock con un promedio de desarrollo de 18 días.

7. ELISA: Método cualitativo y/o cuantitativo que determina la presencia de anticuerpos en el líquido sospechoso mediante la reacción de antígenos específicos, su sensibilidad se estima entre 45-95% y su especificidad de 80 a 100%. El Ag60 es el más empleado cuenta con una sensibilidad y especificidad cercana al 80%.
8. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

De las pruebas anteriormente mencionadas a excepción de las últimas 2 se consideran como convencionales para el diagnóstico de tuberculosis contando con las desventajas de la baja sensibilidad y especificidad del análisis microscópico, su límite inferior de detección es de 10^4 bacilos por mililitro de muestra y el lento crecimiento de las micobacterias patógenas en cultivo ⁽⁷⁾.

Una limitante de los métodos microbiológicos es la sensibilidad pobre para el diagnóstico de tuberculosis en niños y en los casos de tuberculosis extrapulmonar, y para este tipo de infecciones se ha propuesto métodos alternos como la PCR ⁽⁹⁾.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la ampliación de ácidos nucleicos y productos de genes específicos de *M. tuberculosis*. El más estudiado es la ampliación del elemento de inserción IS6110 ⁽⁹⁾.

Es de particular importancia para el diagnóstico de tuberculosis paucibacilares y extrapulmonares ⁽⁷⁾.

Permite la identificación rápida y específica de las micobacterias con un límite inferior de 1-100 por ml de muestra ⁽⁷⁾.

Los objetivos básicos de la PCR:

1. Amplificación ADN
2. Detectar en muestras con pequeñas cantidades un ADN blanco.

La PCR es técnicamente demandante y requiere condiciones especiales del laboratorio ⁽⁵⁾.

Existen varias técnicas para realizar PCR: Convencional, larga, anidada, inversa, con adaptadores, en un paso, en 2 pasos, tiempo real e *in situ*.

La PCR *in situ*: Es un tipo especializado de hidratación en soporte sólido, en la que la sonda se aplica sobre muestras en su ubicación natural, generalmente aquellas preparadas para microscopía. Puede ser cualitativa, diferenciar el tipo de célula que contiene el ADN de la micobacteria y semicuantitativa.

En un estudio publicado en el año 2000 en la revista de Lancet se realizan estudios de PCR *in situ* en superficie de pulmonares para encontrar la persistencia de ADN del *M. tuberculosis* corroborando los resultados obtenidos de ésta con la PCR convencional encontrando resultados similares con ambas pruebas; además la PCR *in situ* demuestra que el ADN del *M. tuberculosis* se sitúa no solo en los macrófagos sino en otras células no fagocíticas logrando demostrar que puede persistir intracelularmente en tejido pulmonar sin evidencia de lesión histológica sin tuberculosis ⁽¹⁰⁾.

Berk RH y cols (1996) realizaron un estudio retrospectivo tomando muestras de parafina de pacientes con Mal de Pott y realizaron PCR encontrando una sensibilidad de 95%, especificidad 83%, VPP 95% y VPN 83% ⁽¹¹⁾.

Sun Y y colaboradores en 1997 concluyeron que la PCR es una prueba rápida, específica y sensible así como un método simple en la detección de *M. tuberculosis* en muestras de tejido óseo. Es de gran valor para diferenciar tuberculosis de otros tipos de enfermedades con una especificidad del 100% ⁽¹²⁾.

Portillo-Gómez L y colaboradores en 2000 encontraron alta especificidad (100%) y sensibilidad (93 a 94%) de la PCR para detectar *M. tuberculosis* en muestras extrapulmonares, en comparación con el método de Ziehl-Neelsen y el cultivo de Lowestein-Jensen ⁽¹³⁾.

Kato MM, Bobadilla MV, Martínez AG en 2002 concluyeron que la PCR es una prueba con eficacia diagnóstica limitada en la Tuberculosis extrapulmonar por lo que se debe de analizar en conjunto con otros datos clínicos, de laboratorio y gabinete. (S50%, E59%, VPP35%, VPN72%) ⁽⁹⁾.

En un estudio realizado por Negi SS y colaboradores en la India en el 2005, compararon PCR, Ziehl-Neelsen, el cultivo de Lowestein-Jensen y BACTEC encontrando que PCR es más sensible y rápida para el diagnóstico de Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, sensibilidad 74.4%, especificidad 97.29% y tiempo promedio de detección 1 día ⁽⁸⁾.

JUSTIFICACIÓN:

El diagnóstico de la tuberculosis osteoarticular frecuentemente se retrasa debido a que las manifestaciones clínicas son inespecíficas y con un curso tórpido.

Suele basarse en el aislamiento del germen ya sea en cultivo o estudio histopatológico, lo cual es lento y tiene una baja sensibilidad y especificidad con un límite inferior de detección de 10^4 bacilos por ml de muestra.

Un método diagnóstico sensible podría prevenir el retraso y permitir la pronta institución de tratamiento antituberculoso para prevenir el daño articular irreversible ya que son potencialmente curables.

La PCR permite la identificación rápida y específica de las micobacterias con límites inferiores de detección que varía de 1 a 100 bacilos por ml de muestra.

HIPÓTESIS:

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica útil para el diagnóstico de la tuberculosis osteoarticular que servirá para comprobar la utilidad del diagnóstico clínico y patológico en el INR.

OBJETIVOS:

- Comparar los resultados anatomopatológico compatibles con tuberculosis y tinción de Ziehl-Neelsen con los resultados de la PCR en la tuberculosis osteoarticular.
- Comparar el diagnóstico clínico con los resultados de la PCR en la tuberculosis osteoarticular.
- Realizar el diagnóstico definitivo de la artritis tuberculosa mediante la PCR.
- Calcular la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN del Dx clínico, Dx anatomopatológico, resultados de ZN tomando como estándar de oro a la PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Diseño metodológico: Es un estudio de prueba diagnóstica, transversal, comparativo y con cegamiento.

Población: Muestras con reporte anatomopatológico de Reacción granulomatosa crónica compatible con Tuberculosis y casos de Tuberculosis osteoarticular con diagnóstico clínico.

Muestra: Bloques de parafina en buenas condiciones a los cuales se les realiza PCR (46 casos).

Criterios de selección:

1. Criterios de inclusión:

- a) Bloques de parafina de pacientes con reporte anatomopatológico compatible con Tb.
- b) Pacientes diagnóstico clínico de Tuberculosis osteoarticular que aparezcan en los reportes de consulta externa y hospitalizados de 1995 al 2005.
- c) Bloques de parafina de pacientes con diagnóstico clínico y patológico de sinovitis, grupo testigo.

2. Criterios de exclusión:

- a) Muestras anatomopatológicas mal conservada

3. Criterios de eliminación:

- b) Pérdida de la muestra al realizar la tinción
- c) Falta de bloques de parafina

Variables:

1. Dependientes: Tuberculosis osteoarticular confirmada por PCR

Sinovitis

2. Independientes: Tuberculosis osteoarticular confirmadas por histopatología.

Diagnóstico clínico de Tuberculosis osteoarticular

La variable de diagnóstico clínico engloba la presentación clínica, los estudios radiográficos y los estudios de laboratorio que nos hacen llegar al diagnóstico de Tuberculosis osteoarticular.

Formación de grupos:

Para la realización de esta investigación se estableció la formación de 3 grupos de estudio:

1. Grupo 1: Se encuentran los pacientes que cuentan con diagnóstico clínico y diagnóstico anatomopatológico de Tuberculosis osteoarticular.
2. Grupo 2: Se encuentran los pacientes que cuentan con diagnóstico clínico de tuberculosis osteoarticular.

3. Grupo 3: Se encuentra formado por el grupo testigo, ya que en un estudio de prueba diagnóstica se requiere este grupo. Los pacientes que forman parte de este grupo cuentan con diagnóstico clínico y patológico de sinovitis.

Procedimientos:

Para obtener a los pacientes con diagnóstico histopatológico de tuberculosis osteoarticular se nos proporciona un concentrado por el Servicio de Patología de este Instituto en donde se encuentra la siguiente información: el número de expediente, el número de biopsia, el diagnóstico clínico y el diagnóstico histopatológico. Posteriormente se introduce en la computadora del instituto el número de expediente y se revisa cada uno de los casos corroborando el diagnóstico clínico, tomando el nombre completo del paciente así como la fecha de la cirugía. A continuación se buscan en los archivos de patología el diagnóstico anatomopatológico de cada uno de los paciente corroborando que efectivamente cuenten con el diagnóstico de tuberculosis reportada como “inflamación granulomatosa crónica compatible con tuberculosis o Mal de Pott”.

Para el grupo con diagnóstico clínico de tuberculosis osteoarticular se solicita al archivo clínico una relación de pacientes con diagnóstico de tuberculosis articular, tuberculosis extrapulmonar, artritis séptica y Mal de Pott del concentrado de hojas diarias y de pacientes hospitalizados. Únicamente se encuentra pacientes con los 2 últimos diagnóstico de tuberculosis osteoarticular y Mal de

Pott, y se anota la fecha de la cirugía. Acudo a patología y en la fecha de la cirugía y el nombre del paciente se busca en las libretas el número de biopsia y después en su archivo anotando el resultado histopatológico.

El grupo testigo se forma con pacientes con diagnóstico histopatológico y clínico que se obtiene de las libretas de patología y se corrobora en el sistema de cómputo y los reportes de patología.

Al contar ya con todos los números de biopsia se buscan los bloques de parafina que son las muestras con las que se realizara el estudio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). No se encuentran algunas muestras de parafina de algunos pacientes.

A los bloques de parafina con los que se cuentan, se realizan cortes de 5micras colocando 2 cortes por laminilla y haciendo 3 laminillas por cada bloque. Una de las laminillas se lleva a INCMNSZ, otra laminilla se queda en el INR para la realización de Ziehl-Neelsen y la otra se queda de reserva.

Ninguna de las laminillas contaba con diagnóstico ni clínico ni patológico para evitar sesgo.

En el laboratorio de Patología Experimental del INCMNSZ se lleva una de las laminillas para realizar la PCR *in situ* determinando la fracción IS6110 para *M. tuberculosis*. A cada una de las laminillas se les realiza el siguiente proceso:

1. Desparafina: Con xilol y temperatura.
2. Hidratan: Con alcoholes a diferentes concentraciones.
3. Permeabilizan
4. Reacción en Cadena de la Polimerasa
5. Revelado
6. Lectura

Para cada muestra se contó con un testigo negativo y con un testigo positivo. El testigo negativo corresponde a uno de los cortes de la laminilla al cual no se le aplicaba toda la reacción para la PCR. El control positivo correspondía al corte en laminilla de una muestra en parafina de un pulmón de ratón inoculado experimentalmente de *M. tuberculosis*. Anexo 2 (figuras de la 1 a la 3).

Toda la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se encuentra en la referencia número 10 de la bibliografía.

Al tener ya teñidas todas las laminillas, se observan en el microscopio y en busca de bacilos teñidos de color azul.

La tinción de Ziehl-Neelsen se llevó a cabo en el laboratorio de Patología del INR contando para cada muestra con un control positivo.

La técnica de Ziehl-Neelsen se muestra en el anexo 1.

Al teñirse todas las laminillas se observan en el microscopio y se reporta cada una de ellas con el número de biopsia y si es positivo o negativo a la tinción.

Análisis estadístico:

Al obtener cada uno de los resultados se introducen a una base de datos en Excel y posteriormente se analizan en el programa SPSS.

RESULTADOS:

Se incluyeron 65 pacientes de los cuales 32 (49.2%) tenían el diagnóstico clínico de Mal de Pott, 17 (26.2%) de tuberculosis articular, 10 (15.4%) de sinovitis y 6 (9.2%) como otros diagnósticos diferentes a tuberculosis osteoarticular.

Se eliminaron 15 pacientes debido a que no se contaba con bloques de parafina para realizar los cortes.

En el revelado de PCR: 4 muestras (2 del Grupo 1 y 2 del Grupo 2) son eliminada debido a que el tejido se barrió durante el proceso de tinción.

En la técnica de Ziehl-Neelsen se procesan las 49 muestras sin haber accidentes durante la técnica.

Se analizaron un total de 46 muestras:

- a) Grupo 1: 28
- b) Grupo 2: 8
- c) Grupo 3: 10

Se cuenta con 34 resultados de patología previos con sospecha de tuberculosis, de los cuales 21 fueron positivos y 13 negativos. Se realizan 49 tinciones de ZN resultando 1 positiva y el resto negativo.

A 46 muestras se les realizó PCR de los cuales 30 fueron verdaderamente positivos y 16 verdaderamente negativos a Tuberculosis.

Tomando a la PCR como estándar de oro, se calcularon los valores diagnósticos del diagnóstico clínico, anatomopatológico y Ziehl-Neelsen, primero en forma general (Tabla 1) y posteriormente dividiendo Mal de Pott y tuberculosis articular por separado. Los 10 pacientes con el diagnóstico de sinovitis fungieron como testigo y en todos ellos PCR resultó negativa.

Valores	Clínica (C)	Patología (P)	Ziehl-Neelsen	En paralelo C+P
Sensibilidad	90.0 (27/30)	75.0 (18/24)	0.0 (0/30)	93.3 (28/30)
Especificidad	62.5 (10/16)	83.3 (5/6)	93.8 (15/16)	62.5 (10/16)
VP +	81.8 (27/33)	94.7 (18/19)	0.0 (0/1)	82.5 (28/34)
VP -	76.9 (10/13)	45.4 (5/11)	33.3 (15/45)	83.3 (10/12)
Exactitud	80.4 (37/46)	76.6 (23/30)	32.6 (15/46)	82.6 (38/46)
Prevalencia de prueba	62.5 (30/46)	80 (24/30)	65.2 (30/46)	62.5 (30/46)

Tabla 1. Poder diagnóstico de la clínica, patología y Ziehl-Neelsen para TB osteoarticular. PCR como estándar de oro (Porcentajes).

Como se observa en la tabla 1, el diagnóstico clínico puro posee una elevada sensibilidad con una relativa baja especificidad; en cambio, patología pura es menos sensible pero es más específica y ambas tienen valores pronósticos positivos altos; Ziehl-Neelsen definitivamente sólo es muy específico. La combinación en paralelo del diagnóstico clínico más patología elevan significativamente la sensibilidad y, con excepción de la especificidad, mejora todos los demás valores diagnósticos.

Al analizar los casos, de 19 clasificados clínicamente como Mal de Pott en 15 de ellos se corroboró el diagnóstico por PCR y 4 se confirmaron verdaderos negativos. En 14 de los 19 casos se efectuó diagnóstico por patología y en los 19 a través de Ziehl-Neelsen. Los valores se concentran en la Tabla 2.

Valores	Clínica	Patología	Ziehl- Neelsen
Sensibilidad	100.0 (15/15)	70.0 (7/10)	0.0 (0/15)
Especificidad	NE	75.0 (3/4)	65.0 (3/4)
VP +	78.9 (15/19)	87.5 (7/8)	0.0 (0/1)
VP -	NE	50.0 (3/6)	16.6 (3/18)
Exactitud	NE	71.4 (10/14)	15.7 (3/19)
Prevalencia de prueba	78.9 (15/19)	71.4 (10/14)	78.9 (15/19)

Tabla 2. Poder diagnóstico de la clínica, patología y Ziehl-Neelsen para Mal de Pott. PCR como estándar de oro (Porcentajes).

Como se puede observar en la tabla 2, lamentablemente los reportes clínicos no permiten evaluar especificidad, valor pronóstico negativo y exactitud pero es fácil calcular que de los 15 casos verdaderos positivos por PCR en todos ellos el diagnóstico clínico de Mal de Pott fue positivo, pero los 4 restantes que no eran Mal de Pott fueron positivos por la clínica, por ello el valor pronóstico positivo fue de $15/19=78.9\%$. No obstante, por medio de patología se pueden identificar falsos negativos (casos que llegan a patología con otro diagnóstico diferente a Mal de Pott que son positivos a la enfermedad en la biopsia); así, véase que patología tiene valores diagnósticos para Mal de Pott medios/altos excepto en el valor pronóstico negativo y ello se debe a que incorpora 30% de falsos negativos (corresponde a 3 casos que desde la clínica fueron identificados como “otros” diagnóstico y que en realidad fueron positivos a Mal de Pott por PCR y que tampoco fueron identificados por patología). Ziehl-Neelsen sólo es medio alto en especificidad.

Respecto a TB articular vuelve a ser notable que la clínica pura es muy sensible y con valores pronósticos positivos elevados, pero al igual que en Mal de Pott sus reportes no permiten identificar falsos negativos lo cual sin es posible con patología. Los valores diagnósticos de patología para tuberculosis articular son muy parecidos a los expuestos para Mal de Pott sólo que mejores e igualmente con excepción del valor pronóstico negativo por dejar 2 casos como falsos negativos que del mismo modo que con Mal de Pott fueron diagnosticados como “otra” enfermedad (tabla3).

Valores	Clínica	Patología	Ziehl- Neelsen
Sensibilidad	100.0 (12/12)	83.3 (10/12)	0
Especificidad	NE	100.0 (2/2)	0
VP +	85.7 (12/14)	100.0 (10/10)	0
VP -	NE	50.0 (2/4)	14.2 (2/14)
Exactitud	NE	85.7 (12/14)	NE
Prevalencia de prueba	85.7 (12/14)	85.7 (12/14)	85.7 (12/14)

Tabla 3. Poder diagnóstico de la clínica, patología y Ziehl-Neelsen para TB articular. PCR como estándar de oro (Porcentajes).

Ahora bien, de 30 casos que tuvieron diagnóstico clínico y de patología simultáneamente y que además se les efectuó PCR, en los positivos verdaderos por PCR la clínica y patología concordaron en clasificarlos positivos en el 70.8 % de ellos (Kappa 0.14, $p = 0.39$) y en los negativos verdaderos por PCR la concordancia fue de 0.0 % (tabla 4).

<u>PCR</u>	<u>Patología</u>	<u>Clínica</u>		TOTALES
		Positivos	Negativos	
Verdaderos positivos	Positivos	17 (70.8%)	1	18
	Negativos	5	1	6
Verdaderos negativos	Positivos	1	0	1
	Negativos	5	0	5

Tabla 4. Concordancia entre clínica y patología para diagnóstico de TB osteoarticular. PCR como estándar de oro.

DISCUSIÓN:

Con excepción de los resultados reportador por Kato MM y cols⁽⁹⁾ que le otorga muy baja sensibilidad y especificidad a la PCR, la mayoría de los autores están de acuerdo en que PCR es altamente específica (con valores hasta de 100 %, inclusive) y sensibilidad que oscila desde 75 % hasta 95 %^(11,12,13), con estos referentes podemos confiar que en nuestro estudio el 100 % de los casos identificados por PCR como negativos en realidad lo sean (16 de 46 casos más 10 testigos de sinovitis) y que el margen de error para los casos considerados positivos sea muy bajo (es decir que podemos aceptar como verdaderos positivos casi al total de los casos detectados positivos por PCR). Con este marco, es importante subrayar que el diagnóstico clínico tienen una alta sensibilidad y por ello genera pocos falsos negativos (10.0 %) que probablemente pudieron haber pasado como pacientes sin la enfermedad o en los que, en el mejor de los casos, se retrasó el tratamiento; por otro lado, la relativamente baja especificidad del diagnóstico clínico genera a su vez una elevada proporción de falsos positivos (37.5 %) que probablemente pudieron ser sujetos a tratamiento antifímico innecesario. No obstante, los estudios histopatológicos y de ZN, siendo poco sensibles, sobre lo cual coincidimos con Negi, Khan y cols⁽⁸⁾, son por otro lado muy específicos y por tanto pueden reducir considerablemente los falsos positivos de la clínica. Ello es tanto más claro para los casos sospechosos de Mal de Pott en los que el diagnóstico clínico es 100 % sensible y el estudio histopatológico 75 % específico.

En cualesquier situación, el punto más discutible es que tanto la clínica pura como patología, dejan a fin de cuentas una importante proporción de casos (entre 6% a 10 %) como falsos negativos.

En consecuencia, la mayor utilidad de PCR en nuestro medio sería la de contribuir a mejorar la sensibilidad de los exámenes clínicos y de patología para reducir los casos de pacientes que pudieran quedar como exentos de tuberculosis osteoarticular cuando en realidad son falsos negativos.

CONCLUSIONES:

Dados los resultados obtenidos y su confrontación con los reportados en la literatura podemos decir que la Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica muy útil para el diagnóstico de la tuberculosis osteoarticular en nuestro medio; y que, mientras los diagnósticos clínico e histopatológico son aceptablemente sensibles, la tinción de ZN es muy específica. En términos generales PCR detectó como verdaderos positivos al 65.2 % de todos los casos sospechosos de Tb osteoarticular y verdaderos negativos al 34.8 % restante. No obstante, cuando la clínica y patología se aplican en paralelo reducen considerablemente los falsos positivos con la consecuente probabilidad de reducir el uso inadecuado o innecesario del tratamiento y, hay suficientes elementos para concluir que en el INR, el principal problema diagnóstico estriba en que hasta un 6-10 % de los pacientes pueden quedar como falsos negativos con la consecuente probabilidad que entre 6-10 pacientes de cada 100 sufran retraso en el diagnóstico y sobre todo en el tratamiento antifímico oportuno.

ANEXO 1:

TÉCNICA DE ZIEHL-NEELEN⁽¹⁴⁾

Para BAAR (Modificada por el Dr. Pablo Dinis).

Fijación: Formalina neutro al 10%

Técnica: Cortes de parafina a 5micras.

Soluciones:

I. Solución carbal fucsina

- Fenol en cristales disueltos 2.5ml
- Alcohol absoluto 5 ml
- Fucsina básica 0.5gr
- Agua destilada 50 ml

Disolver la fucsina en el alcohol, añadir el agua destilada y finalmente agregar el fenol que se disuelve previamente calentándolos en un vaso de precipitado. Filtrar antes de usarse.

II. Solución alcohol ácido clorhídrico

- Alcohol al 70% + 1% de ácido clorhídrico.

III. Solución acuosa de ácido sulfúrico al 1%

IV. Solución stock de azul de metileno

- Azul de metileno 1.4gr
- Alcohol de 96° 100 ml

V. Peróxido de hidrógeno al 30%

Procedimiento:

Usar control.

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
2. Oxidar en peróxido de hidrógeno al 30% a 4°C por 30min. Lavar en 3 cambios de agua destilada.
3. Carbol-fucsina durante 30min a temperatura ambiente.
4. Lavar bien con agua corriente.
5. Diferenciar con 2 cambios de alcohol-acido o hasta que el tejido quede de color rosa pálido.
6. Lavar 10min con agua corriente.
7. Contrastar 2 segundos con sol de trabajo de azul de metileno para que tome un color azul pálido.
8. Deshidratar en alcoholes de diferentes grados, absoluto, alcohol-xilol, 2 xiloles y montar.

Resultados:

Bacilos: Rojo brillante

Eritrocitos: Amarillo, naranja

Otros elementos: Azul pálido.

ANEXO 2:

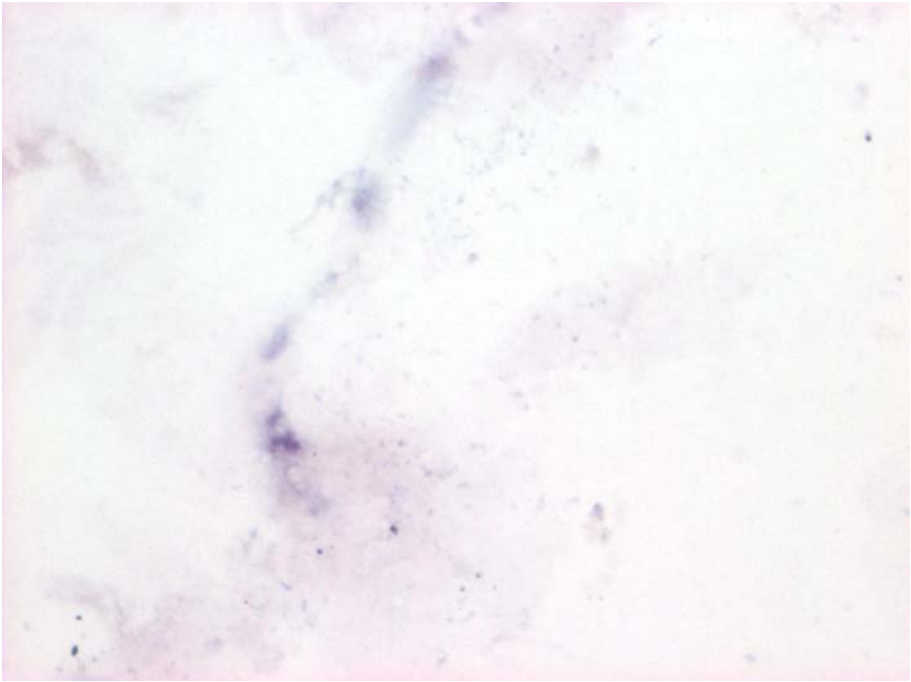


Fig. 1 Control positivo de PCR *in situ* (tinción de pulmón de ratón inoculado experimentalmente con *M. tuberculosis*)

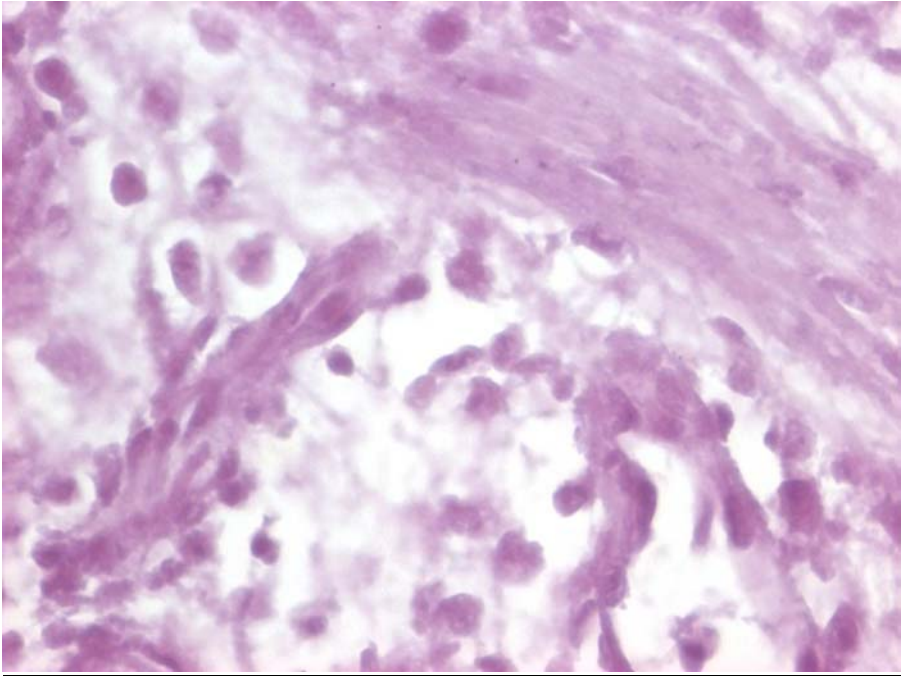


Fig. 2 Control negativo de un caso positivo.

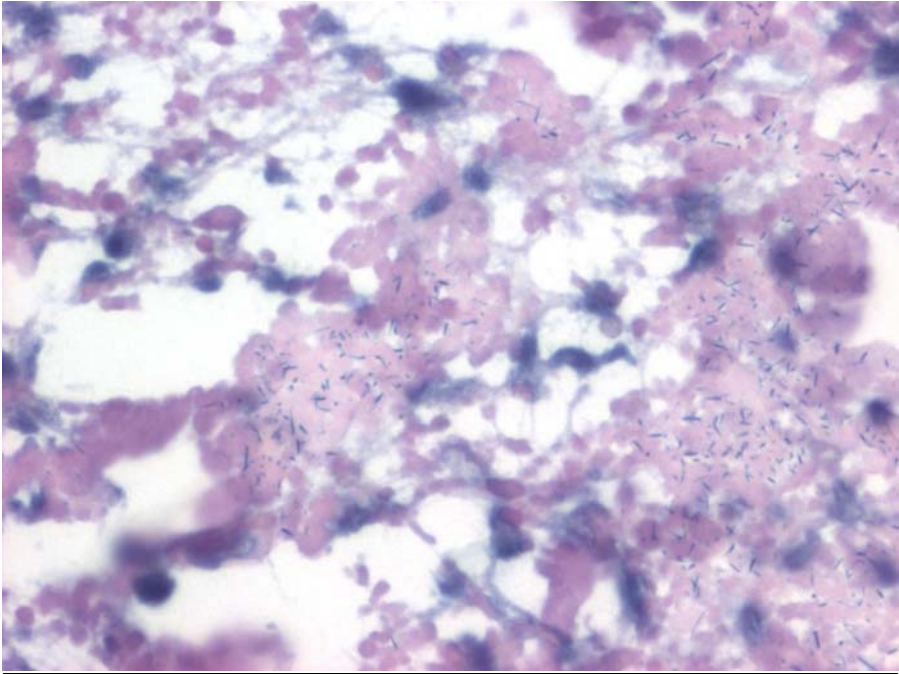


Fig. 3 Caso positivo para *M. tuberculosis* con PCR *in situ*, donde se observan los bacilos de coloración azul.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Ospina S. La tuberculosis, una perspectiva histórica-epidemiológica. *Infectio* 2001; 5(4): 241- 50.
2. Malaviya AN, KotwalPP. Arthritis associated with tuberculosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2003 Apr; 17(2): 319-43.
3. Cepero MR, Martínez LJ, Sosa AM y cols. Osteoartritis tuberculosa. *Rev Cubana Med* 1998; 37(3): 190-4.
4. Campbell, Cirugía ortopédica. 9na edición. Editorial Harcourt Brace, 1998: 627-35.
5. Robledo RJ, Mejía MGI. Actualidad en el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio. *Infectio* 2001; 5(4):251-9.
6. López CLD, Beirana A. Diagnóstico de tuberculosis. Revisión del tema. *Rev Cent Dermatol Pascua* 1999; 8(3): 130-2.
7. Rodríguez AJ, Palma S, Maestre JL y cols. Detección de micobacterias en muestras clínicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Rev Biomed* 2000; 11: 257-62.
8. Negi SS, Khan SFB, Gupta S, Pasha ST, et al. Comparison of the conventional diagnostic modalities, bactec culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis. *IJMM* 2005; 23(1): 29-33.

9. Kato MM, Bobadilla MDV, Martínez GA, Hernández CA y cols. Eficacia e impact de la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. Rev Invest Clin 2002; 54(6): 509-14.
10. Hernández-Pando R, Jeyamatha M, Mengistu D, Aguilar D, y col. Persistent of DNA from *Micobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. Lancet 2000; 356: 2133-8.
11. Berk RH, Yazici M, Atabey N, Ozdamar OS et al. Detection of *Micobacterium tuberculosis* in formaldehyde solution-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction in Pott's disease. Spine 1996; 21: 1991-5.
12. Sun Y, Zhang Y, Lu Z. Clinical study of polymerase chain reaction technique in the diagnosis of bone tuberculosis. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 1997; Jun 20: 145-8.
13. Portillo-Gómez L, Morris SL, Panduro A. Rapid and efficient detection of extra-pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. Int J Tuberc Lung Dis 2000; Apr 4: 361-70.
14. Luna LG. Manual of histologic. 3era ed. Mc Graw-Hill, 1968.