

74

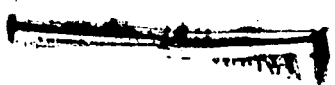


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMO POSIBLE AGENTE ETIOLOGICO DE UNA POLIRRADICULONEUROPATIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
MARIA CONCEPCION GARCIA OLVERA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. EDUARDO SADA DIAZ

MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2002

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Mycobacterium tuberculosis como posible agente etiológico de una polirradiculoneuropatía."

realizado por María Concepción García Olvera

con número de cuenta 9251690-6, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario DR. Eduardo Sada Diaz

Eduardo Sada Diaz

Propietario DR. Guillermo Salgado Maldonado

Guillermo Salgado Maldonado

Propietario Q.F.B. María del Carmen Sarabia Leon

María del Carmen Sarabia Leon

Suplente BIOLOGO. Rogelio Aguilar Aguilar

Suplente BIOLOGO. Rosa Griselda Moreno Navarrete

Rosa Griselda Moreno Navarrete

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA

Patricia Ramos Morales

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**El proyecto se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto nacional de
Enfermedades Respiratorias bajo la dirección del Dr. Eduardo Sada Díaz.**

DEDICATORIA

A ÉL

por que siempre ha estado presente en mi corazón e iluminado mi camino.

Gracias por todo.

A ELLA

que me ha enseñado que el valor esta en todo lo que logramos.

Por su honestida, fuerza, ejemplo y el amor brindado.

Gracias.

A TI

por el amor y felicidad compartida cada día de nuestras vidas.

Gracias.

A ELLOS

por todos los momentos compartidos y cariño que nos une.

INDICE

	Página
Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	2
2. Planteamiento del Problema.....	16
3. Objetivos.....	17
4. Método.....	18
5. Resultados.....	23
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones.....	38
8. Bibliografía.....	39
9. Apéndice.....	45

ABREVIATURAS

SNC	Sistema Nervioso Central
SGB	Síndrome Guillain Barré
PDIC	Polirradiculoneuropatías Desmielinizantes Inflammatorias Crónicas
LCR	Líquido Ceforraquídeo
VIH	Virus Inmunodeficiencia Adquirida
TB	Tuberculosis
MTB	Mycobacterium tuberculosis
BAAR	Bacilos Alcohol Ácido Resistentes
OMS	Organización Mundial de la Salud
TBM	Tuberculosis Meningea
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
IS6110	Secuencia de Inserción 6110
pb	Pares de bases
MPM	Marcador de peso molecular
NCC	Neurocisticercosis
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrofica
HSA	Hemorragia Subaracnoidea
EVC	Enfermedad Vasculal Cerebral
PFP	Parálisis Facial Periférica
METB	Meloma tuberculoso

1. INTRODUCCIÓN.

Las infecciones agudas del Sistema Nervioso Central (SNC) tienen diferentes formas clínicas de presentación dependiendo de los factores generales de toda enfermedad infecciosa, de la capacidad patógena del germen y de los mecanismos defensivos del huésped.(1)

A continuación se describe una de las infecciones del SNC según las formas de presentación clínica que podemos encontrarnos:

NEUROPATIAS.

La neuropatía periférica, es un término genérico que indica un trastorno del nervio periférico de cualquier causa, las manifestaciones pueden ser desconcertantes y complejas. La neuropatía denota trastornos funcionales, cambios patológicos o ambas cosas en el sistema nervioso.

Las neuropatías periféricas son la causa más común de insuficiencia autónoma crónica que afectan a las fibras pequeñas mielinicas y amielinicas de los nervios simpático y parasimpático.

Sintomas y signos:

Los primeros síntomas suelen ser sensitivos, y consisten en sensación de hormigueo, quemazón, pinchazos o disestesias en banda en los talones o las puntas de los dedos de los pies o de forma generalizada en las plantas, suelen ser simétricos con una progresión distal en intensidad.

Al evolucionar el trastorno, suele producirse un déficit pansensitivo en ambos pies, pérdida de reflejos aquileos y debilidad de la flexión dorsal de los dedos de los pies. Cuando el déficit sensitivo ha alcanzado la parte superior de la espinilla, suelen apreciarse disestesias en las puntas de los dedos de las manos. El grado de dolor espontáneo es variable.

La mayor parte de las neuropatías afectan a las fibras de cualquier tamaño aunque a veces la lesión es selectiva para las fibras grandes o pequeñas. Las neuropatías periféricas son la causa más común de insuficiencia autónoma crónica.
(2)(3)

Clasificación:

De acuerdo con la citado por Harrison en 1998, las neuropatías se clasifican en síndromes según la cantidad y forma de la afección:

1. Síndrome de parálisis motora aguda ascendente con alteración variable de la sensibilidad. (Síndrome de Guillain- Barré)
2. Síndrome de Polineuropatías simétricas y asimétricas subagudas. (Deficiencias vitamínicas, por fármacos, y metabólicas)
3. Síndrome de Polineuropatía Crónica Sensitiva y Motora.
4. Neuropatías genéticamente determinadas.
5. Polineuropatía Crónica Recurrente.
6. Síndrome de Mono o Polineuropatía.

ASPECTOS ETIOLOGICOS.

Polineuropatía desmielinizante aguda. Es sinónima del término Síndrome de Guillain-Barré (SGB).El paciente presenta como antecedente una infección, clínicamente manifestada por la elevación de los títulos de los anticuerpos séricos, entre una y tres semanas antes del inicio de la neuropatía. Algunos casos parecen desencadenados por gastroenteritis por Campylobacter jejuni. La mayor parte de los datos sugiere que el SGB es un trastorno de tipo inmunitario, su inmnoapatogenia sigue siendo desconocida.

El Síndrome Guillain-Barré es una complicación rara de la infección por Campylobacter (1 de cada 1000 a 2000 casos). Sin embargo debido a la elevada incidencia de infección por Campylobacter, se calcula en el momento actual que las infecciones por Campylobacter desencadenan un 10 a 30 % de todos los casos de Síndrome Guillain-Barré. Las manifestaciones clínicas típicas del Síndrome Guillain-Barré comprenden parálisis motora y aumento del nivel total de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) al final de la primera semana desde el inicio de la sintomatología. (5)(6)

Neuropatías desmielinizantes adquiridas. Estos trastornos se encuadran en dos grupos principales: la forma aguda llamada SGB y las formas más crónicas, habitualmente denominadas polirradiculoneuropatías desmielinizantes inflamatorias crónicas (PDIC). El diagnóstico está basado en el reconocimiento del patrón clínico y de otras características, como la elevación en el nivel de proteínas en el líquido cefalorraquídeo.

Generalmente se acepta que este grupo de neuropatías esta producido por mecanismos inmunitarios, aunque se desconocen los antígenos específicos implicados, los acontecimientos importantes de la respuesta inmunitaria y el motivo de su activación. Tampoco se sabe si el SGB y las PDIC comparten una inmunopatogenia común.

Neuropatías de la infección por VIH. Las neuropatías son frecuentes en la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), pero existen diferentes tipos de neuropatía según el estadio de la enfermedad. El SGB o las PDIC son las neuropatías más probables tras la seroconversión positiva y en la fase asintomática de la infección por el VIH. (2)

En el presente trabajo se estudiara pacientes con Síndrome Guillain Barré, ya que antecedentes clinicos demuestran que anteriormente tuvieron que ver con infección por Mycobacterium tuberculosis (MTB) y esta podría ser una causa de neuropatía.

CARACTERÍSTICAS DE M. tuberculosis.

La tuberculosis (TB) humana es una enfermedad infecto-contagiosa causada principalmente por M. tuberculosis (MTB), aunque en ocasiones puede ser causada con menor frecuencia por Mycobacterium bovis. (7)

Estos microorganismos son parásitos intracelulares con una gran capacidad para sobrevivir dentro de los macrófagos haciendo uso de mecanismos de evasión como son: 1) inhibir la fusión fagosoma - lisosoma a través del bloque de la enzima H⁺-ATPasa de membrana y no permitir la acidificación del fagosoma, 2) mostrar resistencia a radicales libres de oxígeno y nitrógeno, y 3) escapar al citoplasma y multiplicarse intracelularmente. (8)

Las micobacterias pertenecen a la familia Mycobacteriaceae del orden Actinomycetales y de la clase Schizomicetos. De las especies patógenas que pertenecen al complejo M. tuberculosis el agente más frecuente e importante como causa de enfermedad humana es el propio MTB. (9)

La micobacteria es un bacilo delgado, ligeramente curvado, de 1 a 4 micrones de longitud, que se tiñe en forma irregular, dando un aspecto en cuentas de rosario.

Tiene la pared celular más compleja que todas las bacterias conocidas, una membrana dos veces más gruesa y fuerte que la de los bacilos gram negativos.

En la pared celular de las micobacterias los lípidos (por ej. ácidos micólicos) están unidos a arabinogalactana y peptidoglucanos. Esta estructura es la responsable de la muy escasa permeabilidad de la pared celular y por tanto, de la ineficiencia de la mayor parte de los antibióticos frente a estos microorganismos. Otra molécula de la pared de las micobacterias, la lipoarabinomanana, implicada en la interacción

patógeno - huésped y facilita la supervivencia de MTB en el interior de los macrófagos. (10)

M. tuberculosis es un parásito estricto que puede persistir en bacteriostasis por largos periodos en el interior de las células, no tiene toxinas conocidas.

Es un microorganismo aerobio y tiene un metabolismo y crecimiento que varía, de acuerdo a la tensión parcial de oxígeno en el órgano o lesión donde se localice la infección.((12)(13)(14)

EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS.

Se ha estimado que aproximadamente una tercera parte de la población mundial (1,700 millones) ha sido infectada por M. tuberculosis, constituye un serio problema de salud a nivel mundial y la mayor parte de esta población se encuentra principalmente en los países en desarrollo y está en riesgo de desarrollar la enfermedad.(39)

La forma pulmonar se presenta en aproximadamente el 90% de los casos, un 6% manifiesta en el Sistema Nervioso Central, un 2% se encuentra en el aparato digestivo y un 2% en otras localizaciones.

En el año de 1995 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que un tercio de la población mundial ha estado en contacto con M. tuberculosis, 8 millones de personas tienen la enfermedad y anualmente se registran 3 millones de muertes por tuberculosis. Se prevé que durante los próximos diez años 90 millones de personas padecerán la enfermedad.(19)

Existen factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la enfermedad y algunos de ellos son los escasos recursos económicos, la falta de atención médica, la desnutrición, los estados de inmunodeficiencia, la sobrepoblación, el aumento de la esperanza de vida, el hacinamiento y la mala ventilación en la vivienda.

El resurgimiento de la tuberculosis ha ocasionado que el área de la salud impulsen los estudios de investigación para el diagnóstico, la prevención y el control de la enfermedad.(40)

La tuberculosis en México de acuerdo a los reportes de la Secretaría de Salud con respecto a la mortalidad en 1993 el 81.6% fueron causadas por la tuberculosis pulmonar, el 1.3% por tuberculosis meningea y el 17% por otras formas. (7)

PATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS.

La transmisión de M. tuberculosis se da principalmente por vía aérea, mediante la inhalación de la micobacteria contenida en el núcleo de una gotita de saliva proveniente de un paciente con TB pulmonar activa al toser y/o estornudar. (16)(17)

Cuando la micobacteria llega al pulmón se enfrenta a los macrófagos alveolares que constituyen la primera línea de defensa en el pulmón. En un individuo inmunocompetente la infección es controlada, mientras que en un individuo con una deficiente respuesta inmune la infección progresa hasta la forma activa de la enfermedad. En este caso, en pocos días el microorganismo se multiplica ilimitadamente en el interior del macrófago evadiendo los mecanismos bactericidas intracelulares hasta que la célula muere y las nuevas bacterias son ingeridas por otros macrófagos repitiéndose el proceso, hasta que en el sitio se forma la lesión primaria.(7)(9)(37)

Si los macrófagos son incapaces de matar a la micobacteria, ésta se multiplicará libremente en el citoplasma, pudiendo llegar a destruirlos, liberándose en el medio extracelular y algunas micobacterias serán transportadas por la circulación linfática o dentro de los macrófagos a los ganglios hiliares y del mediastino; desde allí entran a torrente sanguíneo y se diseminarán por todo el organismo, produciendo las formas extrapulmonares de la enfermedad.

En el humano la resistencia frente a la tuberculosis depende esencialmente de la inmunidad mediada por células confiriéndole cierta protección y los macrófagos y los linfocitos T son las células involucradas en este tipo de respuesta.

Los macrófagos son células efectoras al fagocitar a la micobacteria para posteriormente funcionar como célula presentadora de antígenos ante los linfocitos T, lo que estimulará la producción de citocinas. De esta manera los macrófagos pueden condicionar el tipo de respuesta inmune secundaria. Sin embargo, la misma respuesta inmunológica puede ser la responsable indirecta del daño tisular característico de la enfermedad.

En la tuberculosis la respuesta inmune es muy variable, dependiendo de varios factores como son las características genéticas del individuo, de su edad, de sus condiciones nutricionales y del ambiente epidemiológico que lo rodean.(17)(18)

FORMAS CLINICAS DE LA ENFERMEDAD.

tuberculosis pulmonar: Es la principal forma de la enfermedad condicionada en parte por la vía de entrada de la micobacteria y se identifica por la presencia de tubérculos y necrosis caseosa, que en la mayoría de los casos provoca un cuadro crónico caracterizado por tos, expectoración, fiebre y ataque al estado general, aunque en la tercera parte de los casos existe afección de otros órganos. La infección en el pulmón puede condicionar a las formas extrapulmonares como: TB renal, TB pleural, TB meningea. Considerando la patogenia de la infección, la bacteria puede diseminarse de los pulmones, que constituye la principal vía de entrada, hacia los sitios como son los ganglios linfáticos, los riñones, los cuerpos vertebrales y el sistema nervioso central por vía hematogena para posteriormente crear focos de infección que darán origen a las formas extrapulmonares de la enfermedad. (7)(9)(10)

tuberculosis meningea: La tuberculosis meníngea (TBM) se presenta con mayor frecuencia en menores de 10 años representa aproximadamente el 5% de los casos extrapulmonares. Su desarrollo sigue a una diseminación hematológica de M. tuberculosis al Sistema Nervioso Central ocurrida durante la etapa de infección inicial o más tarde como resultado de la caseificación del sitio primario u otros sitios. (38) En la niñez, con frecuencia la infección es sintomática con tendencia de producir la linfadenitis extensa o diseminación linfohematológica progresiva con enfermedad miliar o meningea. El inicio de la infección se manifiesta por fiebre y tos leve, que se resuelve en unos pocos días. La TBM se acompaña de meningitis en un 30% de los casos. Durante la diseminación linfohematológica, la micobacteria puede alcanzar todas las partes del Sistema Nervioso Central y producir meningitis tuberculosa, tuberculomas y abscesos cerebrales tuberculosos. Los signos y síntomas dependen en gran medida del sitio de las lesiones y de su grado de extensión.(5)(3)

La TBM es consecuencia del desarrollo de tubérculos, lesiones subpiales, que se desarrollan posteriormente a diseminación temprana hacia el SNC. Se desconocen los estímulos específicos de estas lesiones, sin embargo, se cree que existen mecanismos inmunológicos involucrados en estos procesos. Cuando las lesiones se llegan a romper en el espacio subcranoideo o en el sistema ventricular ocasionan la meningitis.(20)

DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS.

El bacilo tuberculoso no sólo puede afectar a casi todos los órganos, sino también da lugar a cuadros clínicos polimorfos con afectación sistémica. Por ello, se debe sospechar la infección tuberculosa ante cualquier cuadro clínico compatible con esta enfermedad (síntomas respiratorios, poliadenopatías, derrame pleural, síndrome constitucional o cuadro febril), sobre todo en los individuos pertenecientes a grupos de mayor incidencia. Se recomienda además investigar su posible presencia en toda persona que consulte por sintomatología respiratoria (tos, expectoración, hemoptisis,

dolor torácico) de dos o más semanas de duración, sin otra causa conocida. El diagnóstico de certeza se basa en el aislamiento de M. tuberculosis y, por tanto, en el cultivo del microorganismo; los otros métodos sólo proporcionan un diagnóstico de sospecha, con mayor o menor especificidad.

1. Estudios de imagen. La radiografía de tórax es un método sensible pero muy poco específico para el diagnóstico de la tuberculosis pleuropulmonar. Su utilidad es limitada ya que existen imágenes radiológicas muy similares a las producidas por infección con M. tuberculosis que son ocasionadas por otros microorganismos infectantes e incluso por enfermedades pulmonares de tipo no infeccioso. Estos problemas han determinado que para establecer un diagnóstico acertado es necesario respaldarse en pruebas bacteriológicas de laboratorio como son el aislamiento e identificación de la bacteria.

2. Estudios microbiológicos. El esputo es el espécimen más frecuente examinado para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BARR). Se deben recoger un mínimo de tres especímenes en días sucesivos. La concentración del bacilo tuberculosos en esputo está estrechamente relacionada con el carácter y la extensión de la lesión pulmonar. El lavado gástrico puede ser útil cuando no se puede obtener esputo. También es posible determinar la micobacteriemia con los métodos microbiológicos actuales.

a) Examen microscópico. La observación directa de micobacterias mediante la tinción de Ziehl-Nielsen en cualquier muestra biológica posee altas especificidad y sensibilidad diagnósticas. También es posible la visión directa de micobacterias con la tinción de auramina-rodamina, que posee mayor sensibilidad pero requiere un microscopio de fluorescencia. Siempre debe confirmarse con el cultivo para descartar otras especies de micobacterias.

b) Cultivo. El cultivo del bacilo de Koch es el único método de certeza diagnóstica. Con el método tradicional de Lowenstein el crecimiento se obtiene a las 2 ó 4 semanas de la siembra, pero no puede detectarse su positividad hasta las 6 u 8 semanas.

El cultivo constituye el estándar de oro y proporciona una especificidad del 100% además de permitirnos realizar pruebas bioquímicas de caracterización y pruebas de susceptibilidad a los aislados. Sin embargo, la principal desventaja que tiene son los largos periodos de tiempo que se requieren para obtener los resultados.

3. Estudio histológico. Es especialmente útil en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar si se han excluido otras enfermedades granulomatosas. La presencia de granulomas sugerentes de tuberculosis (granulomas epiteloideos con necrosis central caseificante) en una muestra suele ser suficiente para iniciar el tratamiento. Es necesario procesar microbiológicamente las biopsias para confirmar el diagnóstico.

4. Otras pruebas. Otra alternativa para el diagnóstico han sido las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que nos permiten analizar la respuesta humoral de los pacientes con tuberculosis hacia determinados antígenos micobacterianos y han mostrado ser útiles en algunas situaciones clínicas, pero su sensibilidad y especificidad en términos generales son poco satisfactorias.(41)

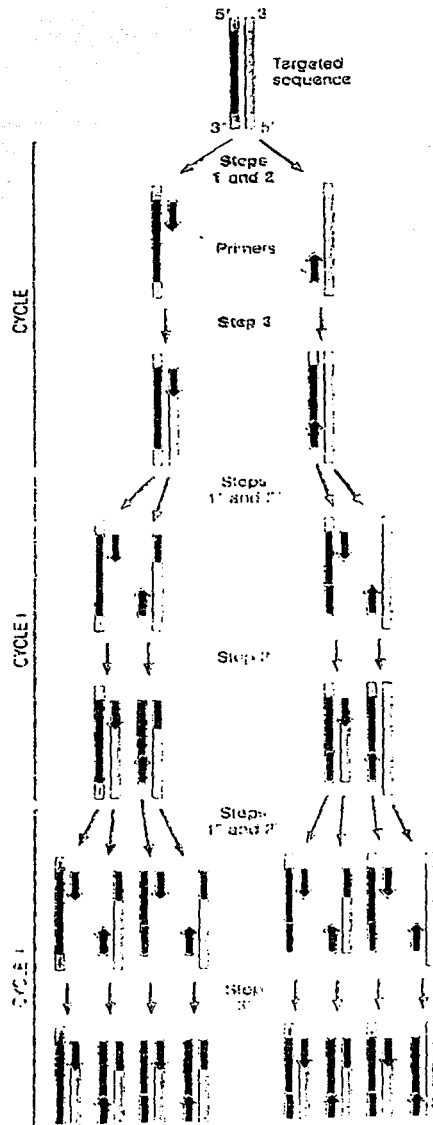
Un método actual que se encuentra en desarrollo es La Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Permite el diagnóstico rápido de la enfermedad (72 horas), en muestras con mínimo inóculo (LCR y líquido pleural), y detecta de manera temprana la presencia de mutaciones genéticas que codifican resistencia a fármacos, para su uso conjunto con el cultivo en el procesamiento de muestras respiratorias que sean tinción BARR positivas y procedan de enfermos no tratados, siendo su sensibilidad y especificidad del 95.5% y 100% respectivamente.(21)(22)(23)(24)(25)

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

El termino Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) creado por Kary Mullis en 1983, se aplica al proceso bioquímico *in vitro* de un fragmento específico de ADN en unas cuantas horas, mediante el cual las cadenas individuales del ADN molde son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos de amplificación (generalmente de 20 a 30), al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, al servir como molde de ADN lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. Los componentes requeridos para un PCR son: molde ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que limitan el gen o fragmento de ADN de interés en la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's); solución amortiguadora de reacción, y la enzima ADN polimerasa. (26)

Cada uno de los ciclos de reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son: 1) Desnaturalización (94-95°C), en el cual se separan las dos cadenas complementarias del ADN por efecto de la temperatura y en presencia de un exceso de los dos oligonucleótidos, los cuatro dNTP's y la Taq polimerasa. En este paso, las dos cadenas de ADN se separan dando lugar a cadenas sencillas de ADN. 2) Unión ó alineamiento de los iniciadores, la temperatura de la mezcla de reacción es disminuida para permitir que los oligonucleótidos iniciadores se unan por complementariedad a las cadenas sencillas de ADN en su extremo 5' y funcionen como iniciadores de la síntesis. Típicamente estos oligonucleótidos iniciadores tienen secuencias diferentes entre sí y son complementarios a las secuencias de las cadenas opuestas del molde de ADN, además limitan el tamaño del fragmento que va a ser amplificado. La temperatura de unión depende de la longitud y secuencia de los oligonucleótidos. 3) Y por último la síntesis de las nuevas cadenas (70-74°C) del ADN llevada a cabo por la enzima Taq polimerasa.

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial del segmento de ADN específico. Al final se tienen millones de copias de un fragmento de ADN de doble



Amplificación de un fragmento de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

cadena con un peso específico. (26)(5) Los productos amplificados son analizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa y son teñidos con Bromuro de Etidio y las bandas de amplificación se observan bajo luz ultravioleta.(36)

Cabe mencionar que fragmentos más largos de ADN son generados durante la reacción, ya que los productos que se generan en los primeros ciclos son moléculas de ADN heterogéneo, donde la longitud excede la distancia entre los sitios de unión de los iniciadores. En el segundo ciclo, las moléculas de ADN de tamaño bien definido se acumularan en forma exponencial en los siguientes ciclos y serán los principales productos de la reacción.

VENTAJAS DE LA PCR.

En el diagnóstico de la TB ha mostrado ventajas sobre otras técnicas, la técnica de PCR detecta el material genético de 1 a 100 bacterias en muestras clínicas mientras que en la tinción se requiere de 5 000 – 10 000 bacterias por mililitro de muestra. La hibridación requiere de 100 000 bacterias provenientes de cultivos puros y el cultivo requiere de una gran carga bacteriana con buena viabilidad.

La PCR puede determinar la presencia del material genético aun de las bacterias muertas, mientras que en las técnicas como el cultivo, la tinción, el Bactec y la hibridación se requiere, que, las bacterias, se, encuentren, vivas., Los resultados por PCR se obtienen en 1 ó 2 días, por Bactec de 7-14 días y por cultivo de 3 a 6 semanas. Los resultados por tinción e hibridación se obtiene en unas cuantas horas, aunque la tinción no nos permite diferenciar a M. tuberculosis de las otras especies, mientras que en la hibridación se requiere de cultivos puros ya que cuando se analizan directamente las muestras, la sensibilidad disminuye.

La sensibilidad y especificidad del PCR es de 90-100% en muestras clínicas, la hibridación ha mostrado una sensibilidad y especificidad cercana al 100% en cultivos puros, mientras que la tinción y el cultivo muestran una alta sensibilidad del 75% en TB pulmonar. (27)(28)(11)

APLICACIÓN DE LA PCR EN LA TUBERCULOSIS.

En 1988 Eisenach y Cols identificaron de 10 a 16 secuencias repetitivas en el cromosoma de M. tuberculosis y posteriormente determinaron la secuencia de nucleotidos de la Secuencia de Inserción 6110.

La Secuencia de Inserción 6110 es específica del complejo de M. tuberculosis (M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum y M. microti) el cual es caracterizado por ser un elemento genético móvil que generalmente se encuentra de 10 a 20 copias en el cromosoma de M. tuberculosis y de las copias en M. bovis. La especificidad y la naturaleza repetitiva de IS6110 lo han hecho ideal para llevar a cabo la amplificación por PCR con fines diagnósticos ya que permite incrementar la sensibilidad. (29)(30)

Para 1990 amplificaron un fragmento de 123 pb de IS6110 y se demostraron la especificidad de la amplificación al utilizar moldes de ADN de diferentes micobacterias en donde la amplificación se lleva a cabo con el ADN de las micobacterias pertenecientes al complejo Mycobacterium tuberculosis, considerando el limite de detección por la PCR a una copia del cromosoma de M. tuberculosis. (31)

Por otra parte se amplificó el mismo fragmento en muestras de esputo de pacientes con TB pulmonar y la amplificación resulto con buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico.(32) En el diagnóstico de pericarditis tuberculosa, la amplificación se llevó a cabo en muestras de líquido pericardio y sangre de pacientes con tuberculosis, en la cual obtuvieron una sensibilidad y una especificidad del 100%. (33)(34)(35)

La secuencia de los oligonucleotidos o iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del AND de interes. Los oligonucleotidos utilizados en el presente trabajo para llevar a cabo la amplificación del fragmento de AND de 123 pb de la secuencia dIS6110 se describe a continuación:

5' - CCT GCG ACG GTA GGC GTC GG - 3'

5' - CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG - 3'

(Eisenach K, J Inf Dis. 1990)

Es uno de los parámetros más importante que determina la especificidad de la PCR. Idealmente, en cada 100 1 de reacción, la concentración aceptable de cada uno de los oligonucleotidos oscila entre 0.1 y 0.5 mM. El uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleotidos. La longitud de los oligonucleotidos debe ser de 18 a 20 nucleotidos, teniendo una composición de 50 a 60 % de G + C.

En este estudio analizaremos pacientes que presentan como diagnóstico Síndrome Guillaín-Barré y con el antecedente clínico de haber estado en contacto con la mocobacteria para determinar si esta se puede considerar como un agente etiológico de esta polineuropatía. (31)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las polineuropatías pueden tener diversas etiologías y dentro de los agentes infecciosos se encuentran Campylobacter jejuni y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Estudios de pacientes con neuropatías llevados a cabo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía han hecho sospechar que otro agente etiologico de este padecimiento puede ser Mycobacterium tuberculosis, ya que la historia clínica de los pacientes refiere una infección anterior por ésta micobacteria.

La demostración de la presencia de M. tuberculosis en muestras de líquido cefalorraquídeo está limitada por el número de micobacterias y además por las limitaciones de los métodos tradicionales para su diagnóstico como son el cultivo y la baciloscopía. Sin embargo, la técnica de PCR es una de las técnicas de biología molecular que constituye una nueva alternativa en la detección de M. tuberculosis ya que tiene una alta sensibilidad y especificidad y así permite detectar un bajo número de micobacterias (1 a 10) mediante la amplificación de una secuencia específica del material genético de M. tuberculosis.

3. OBJETIVOS.

1. Determinar si se puede considerar a M. tuberculosis como posible agente etiológico en pacientes con diagnóstico de una polineuropatía sinónima del Síndrome Guillain-Barré.
2. Evaluar la utilidad de la técnica PCR para respaldar el diagnóstico de una polineuropatía sinónima del Síndrome Guillain-Barré con antecedentes por contacto con M. tuberculosis.

4. METODO.

4.1. Muestras clínicas.

En este trabajo se analizaron 100 muestras de LCR de pacientes con polineuropatías y controles mediante la técnica de PCR, amplificando un fragmento de 123 pb del gene IS6110.

4.2. Líquido cefalorraquídeo.

Las muestras de LCR fueron proporcionadas por el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Estas les fueron tomadas a los pacientes por punción lumbar y se almacenaron a -20°C , hasta ser procesadas para la PCR. Las muestras fueron clasificadas en grupos de acuerdo a los datos del laboratorio y hallazgos clínicos.

Grupo I. En este grupo se incluyeron 40 muestras de LCR de pacientes con Polineuropatía desmielinizante aguda del término del Síndrome Guillain-Barré con posible M. tuberculosis.

Grupo II. En este grupo se incluyeron 40 muestras de LCR de pacientes con otro tipo de infecciones neurológicas diferentes a Síndrome Guillain-Barré, como: Neurocisticercosis (NCC), Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), Hemorragia Subaracnoidea (HSA), Enfermedad Vasculare Cerebral (EVC), Parálisis Facial Periférica (PFP), Parkinson Vasculare, Linfoma medular, Schwannoma, Demencia Alzheimer, Meningioma, Sx cerebeloso, Papiloma de Plexos.

Grupo III. En este grupo se incluyeron 10 muestras de LCR con el meloma tuberculoso. (METB)

4.3. Bacteria.

M. tuberculosis H37Rv es la cepa virulenta con la cuenta el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y se creció en el medio Lowenstein-Jensen.

4.4. Procedimiento de extracción de ADN.

a) Extracción. Se tomaron 100 μ l de líquido cefalorraquídeo y se depositaron en un tubo de 1.6 ml. (Robbins Scientific). Posteriormente la muestra se sometió a centrifugación en una microcentrifuga (Eppendorf 5415 C) a 14 000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200 μ l de solución de lisis (Tris 1M, pH= 8.0) conteniendo Proteinasa K (Sigma, St Louis, MO) a una concentración de 2 mg/ml. Se dejó incubar en baño maría a una temperatura de 56°C toda la noche.

Al día siguiente cada muestra fue tratada con 200 μ l de la mezcla orgánica cloroformo - alcohol isoamílico (49:1), agitando en vortex 10 segundos y centrifugando a 14 000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se recuperó y se transfirió a otro tubo y el ADN fue precipitado con una mezcla fría de 20 μ l de acetato de sodio (3M, pH= 5.2) y 700 μ l de etanol absoluto (Merck). Se dejó 30 min. a -20°C para favorecer la precipitación del ADN y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el ADN. Posteriormente se resuspendió en 15 μ l de agua destilada estéril.

4.5. Preparación de las muestras para la amplificación de ADN por PCR.

En un tubo de 1.6 ml se preparó la mezcla de reacción, cuyos componentes son:

Componentes	Cantidad por tubo
Agua destilada esteril	6.5 μ l

Buffer 10 X	2.5 μ l
dNTP's 10 Mm %	4.0 μ l
Iniciador B3 20 ng/ μ l	3.0 μ l
Iniciador B4 20 ng/ μ l	3.0 μ l
DNA Taq polimerasa 1unidad/ μ l	1.0 μ l
ADN de las muestras	5.0 μ l

NOTA: La suma total de los componentes es de 20 μ l más 5 μ l de DNA= 25 μ l Además se consideran dos tubos más para RC (control de reacción) y un tubo que será nuestro control positivo.

Depositar 20 μ l de la mezcla en cada tubo de 0.6 ml. Agregar una gota de aceite mineral a cada tubo. Depositar 5 μ l del DNA de las muestras en cada tubo. Colocar los tubos en un termociclador (Perkin Elmer Cetus).

Control Negativo: En cada experimento se incluyó un control negativo de la amplificación, el cual contiene todos los componentes de la reacción, excepto el ADN de la micobacteria, cuyo volumen fue sustituido con agua.

Control Positivo: Este control en cada experimento contiene 5 pg de ADN de M. tuberculosis, el cual nos permite verificar que en las muestras corridas se encuentra el ADN de la micobacteria.

Condiciones estandarizadas. Se utilizó 2.5 mM de MgCl², 60 ng de cada uno de los iniciadores y 1.0 unidad de Taq polimerasa por reacción. En cada experimento se incluyó un control positivo constituido por 1 pg de ADN de la cepa de referencia de M. tuberculosis.

La amplificación se llevó a cabo durante 45 ciclos, cada ciclo con: 1 min. a 72°C, 1 min. a 68°C y 1 min. a 72°C con extensión de 2 seg. por ciclo. El último ciclo de la síntesis fue prolongado por 8 min.

4.6. Análisis electroforético de ADN.

4.6.1. Productos amplificados por PCR. Los productos amplificados por PCR son analizados por electroforesis, utilizando un gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 1X (Tris 89 mM, pH = 8.3, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Se tomaron 23 μ l del producto de PCR y se mezclaron con una gota de buffer de carga y se realizó la electroforesis durante 1.5 hr a 70 V, incluyendo en cada electroforesis el marcador de peso molecular 123 pb DNA ladder (Gibco). El producto de amplificación de 123 pares de bases se visualiza mediante la tinción con Bromuro de Etidio (Sigma) y las bandas de amplificación se observan bajo luz ultravioleta, documentando con una fotografía.

4.7. Sensibilidad y especificidad.

Ambos parámetros son característicos de las pruebas de diagnóstico y fueron calculados utilizando las siguientes formulas.

$$\% \text{ sensibilidad} = \frac{\text{Número de sujetos con resultado positivo} \times 100}{\text{Numero total de sujetos enfermos}}$$

$$\% \text{ especificidad} = \frac{\text{Número de sujetos no enfermos con resultado negativo} \times 100}{\text{Número total de sujetos sin la enfermedad}}$$

4.8. Análisis Estadístico.

Para evaluar la relación entre el diagnóstico y la PCR se utilizó la Kappa (K) .

$$K = \frac{O - C}{1 - C}$$

Donde:

K = Concordancia más allá de la probabilidad dividida entre la cantidad de concordancia más allá de la probabilidad.

O = Concordancia observada

C = Concordancia por probabilidad

5. RESULTADOS.

El presente trabajo se inició con la extracción de ADN de 5 muestras de LCR tomadas al azar, a las cuales se les realizó PCR y los productos fueron amplificados en electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2 %. Para el análisis se tomó ADN previamente extraído de las muestras de LCR y el fragmento de 123 pb se amplificó utilizando las condiciones ya estandarizadas. Algunos de los resultados se muestran en las siguientes figuras y se resume en las tablas 1, 2 y 3. Las muestras fueron procesadas de manera ciega y fueron analizadas una vez más para corroborar resultado

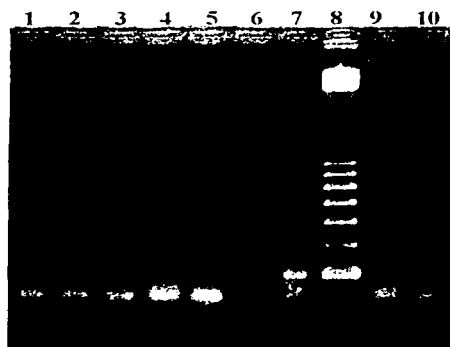


Figura 1

Líneas: 6-9 y 10.- Controles negativos de PCR; 1-2-3 y 4.- SGB; 5.-Enf. diferente de SGB; 7.- Control Positivo de PCR; 8.- MPM (123pb)

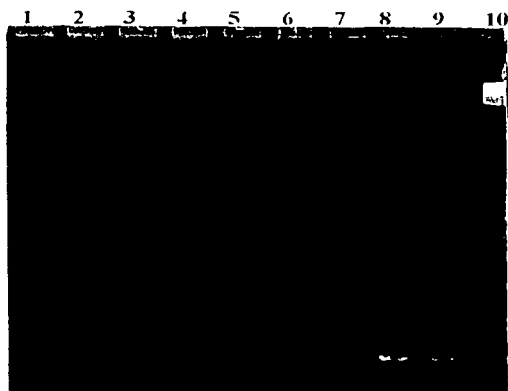


Figura 2

Líneas: 1-3 y 6.- Controles negativos de PCR; 4 y 5.- SGB; 8 y 9.- Controles Positivos de PCR; 10.- MPM (123pb)

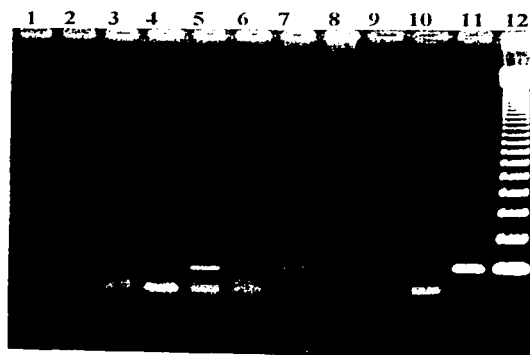


Figura 3

Líneas: 1-3 y 10.- Controles negativos de PCR; 4-5 y 6.- METB; 7.- Enf. diferente a SGB; 8.- SGB; 11.- Control Positivo de PCR; 12.- MPM (123pb)

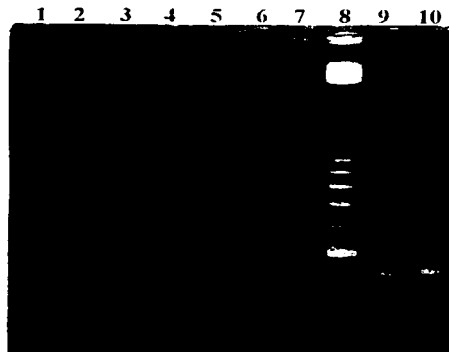


Figura 4

Líneas: 6-9 y 10.- Controles negativos de PCR; 1-2-3-4- y 5.- Enf. diferentes a SGB; 7.- Control Positivo de PCR; 8.- MPM (123pb)

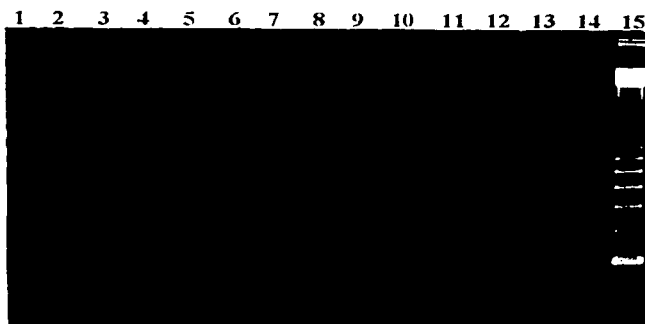


Figura 5

Líneas: 1-2 y 13.- Controles negativos de PCR; 3-4-5-6-7-8-9-10-11 y 12.- SGB; 14.- Control Positivo de PCR; 15.- MPM (123pb)

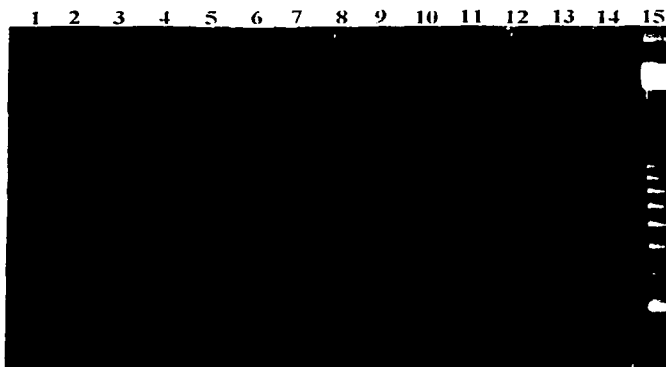


Figura 6

Líneas: 1-2 y 13.- controles negativos de PCR; 3-4-5-6-8-9-10-11-12.- SGB; 7.- METB; 14.- Control Positivo de PCR; 15.- MPM (123pb)

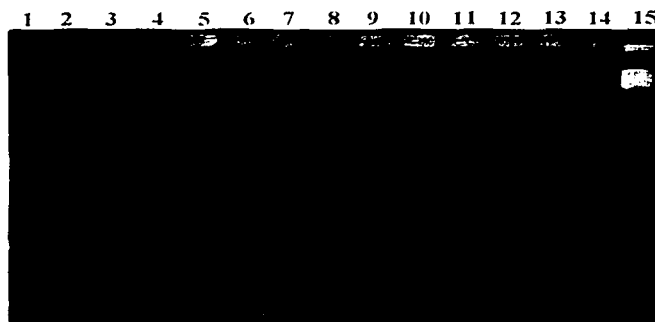


Figura 7

Líneas: 1-2 y 13.- Controles negativos de PCR; 3-4-5-6-7-8-9-10-11-12.- SGB; 14.- Control Positivo de PCR; 15.- MPM (123pb)

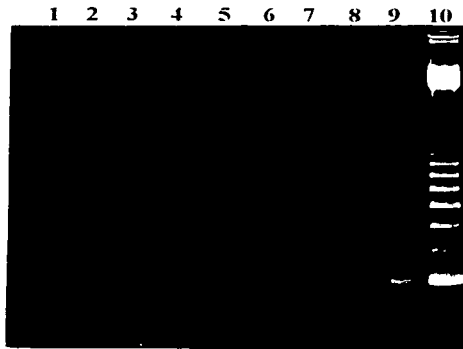


Figura 6

Líneas: 1-2 y 8.- Controles negativos de PCR; 3-4-5-6 y 7.- SGB; 9.- Control Positivo de PCR; 10.- MPM (123pb)

TABLA 1**Resultados de los líquidos cefalorraquídeos analizados por la técnica de PCR**

LCR	Diagnóstico	Resultados
101 - 78	SGB	Negativo
126	SGB	Negativo
260	SGB	Negativo
380	SGB	Negativo
465 - 448	SGB	Negativo
503	SGB	Negativo
580 - 568	SGB	Negativo
983 - 1005	SGB	Negativo
1192	SGB	Negativo
1255 - 1206	SGB	Negativo
1382	SGB	Negativo
1403	SGB	Negativo
1496	SGB	Negativo
1580 - 1589	SGB	Negativo
1740	SGB	Negativo
1783 - 1820	SGB	Negativo
1809	SGB	Negativo
1873	SGB	Negativo
1947	SGB	Negativo
2033	SGB	Negativo
2083	SGB	Negativo
2129	SGB	Negativo
2292	SGB	Negativo

LCR	Diagnóstico	Resultados
2454	SGB	Negativo
2485	SGB	Negativo
2527	SGB	Negativo
2700	SGB	Negativo
2864	SGB	Negativo
2869 - 3027	SGB	Negativo
2872	SGB	Negativo
2898	SGB	Negativo
2991	SGB	Negativo
3026	SGB	Negativo
3049	SGB	Negativo
3072	SGB	Negativo
3111	SGB	Negativo
3124	SGB	Negativo
3183	SGB	POSITIVO
3185	SGB	POSITIVO
2958	NCC	Negativo
3103	NCC	Negativo
3119	NCC	Negativo
2912	NCC	Negativo
2947	NCC	Negativo
3130	NCC	Negativo
3114	NCC	Negativo
2952	NCC	POSITIVO
2995	NCC	POSITIVO

LCR	Diagnóstico	Resultados
2437	HSA	Negativo
3029	HSA	Negativo
2895	HSA	Negativo
2880	HSA	Negativo
2695	HSA	POSITIVO
2652	EVC	Negativo
2559	EVC	Negativo
3031	EVC	Negativo
3149	EVC	Negativo
2697	EVC	POSITIVO
2748	Demencia Alzheimer	Negativo
3171	Demencia Alzheimer	Negativo
2032	Demencia Alzheimer	POSITIVO
2678	Meningioma	Negativo
2952	Meningioma	Negativo
3114	Meningioma	Negativo
2949	Linfoma medular	Negativo
3064	Linfoma medular	Negativo
3190	Sx cerebeloso	Negativo
2951	Sx cerebeloso	POSITIVO
3105	GBM	Negativo
2903	GBM	Negativo
2484	Schwanoma	Negativo
2692	Linfoma cerebral	Negativo
3009	ELA	Negativo

LCR	Diagnóstico	Resultados
3179	PSP	Negativo
2850	Parkinson Vascular	Negativo
3115	Papiloma de Plexos	POSITIVO
3178	Sx Demencial	Negativo
1932	Distonia Deformante	Negativo
2549	Canal Estrecho C .	Negativo
1062	METB	Negativo
1270	METB	Negativo
1697	METB	Negativo
2667	METB	Negativo
3069	METB	POSITIVO
2374	METB	POSITIVO
2578	METB	POSITIVO
1321	METB	POSITIVO
954	METB	POSITIVO
842	METB	POSITIVO

TABLA 2**Amplificación del fragmento de 123 pb del gene IS6110 de MTB en muestras de LCR.**

GRUPO	(n)	PCR (+/-)	%SENSIBILIDAD
SGB	40	2 / 38	
ENF. DIFERENTES	40	9 / 31	
METB	10	6 / 4	60 %

Sensibilidad = 60%**Especificidad = 77.5 %****TABLA 3****Concordancia observada entre el diagnóstico y la PCR**

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
SGB c/ MTB POSITIVO	2	38	n= 40
Enf. Dif. NEGATIVO	9	31	n= 40
TOTAL	11	69	80

positivos por casualidad

$$40 \times 11$$

$$\text{-----} = 5.5$$

80

negativos por casualidad

$$69 \times 40$$

$$\text{-----} = 34.5$$

80

$A+B / 80 =$ Concordancia por probabilidad o casualidad

$$\frac{5.5 + 34.5}{80} = \frac{40}{80} = 0.5$$

$K = O - C / 1 - C$ Concordancia observada

$$0.025 \% + 0.38 \% = 0.40 \%$$

$$0.40 - 0.5$$

$$K = \frac{0.40 - 0.5}{1 - 0.5} = 0.2$$

Del grupo de pacientes con Síndrome Guillain-Barré que incluyeron 40, dos demostraron una prueba de PCR positiva para la detección de Mycobacterium tuberculosis, en tanto 38 fueron negativos.

Cabe mencionar que obtuvimos cuatro falsos negativos en el grupo del Meloma tuberculoso (METB) y nueve falsos positivos en nuestro grupo de enfermedades diferentes a SGB.

Esta técnica proporciono un 60 % de sensibilidad para el diagnostico de METB y una especificidad del 77.5 %.

Con la finalidad de corroborar los resultados positivos y determinar si los casos negativos observados son, las muestras fueron procesadas por segunda vez.

6. DISCUSIÓN.

Anteriormente el diagnóstico de la tuberculosis se establecía con el cultivo y la tinción (BAAR), métodos que han sido de gran utilidad durante mucho tiempo, los cuales presentan desventajas como es el tiempo en el cultivo ya que este es de 6 u 8 semanas, mientras que la tinción no puede diferenciar a M. tuberculosis de las otras especies de micobacterias.

Considerando que la tuberculosis no es aún una enfermedad derrotada y que ha reaparecido nuevamente como epidemia registrando un incremento en el número de casos a nivel mundial, asociada a factores como son la pobreza, VIH y cepas multirresistentes a drogas antituberculosas esto llevo a implementar nuevos métodos para diagnosticar la enfermedad de una manera rápida sensible y específica con respecto a los que ya existen.

Estableciendo el diagnóstico preciso y oportuno de manera temprana es posible iniciar el tratamiento de los pacientes y así de esta manera erradicar los focos de infección. Uno de los propósitos es que los nuevos métodos permitieran establecer el diagnóstico de las formas extrapulmonares de la enfermedad difícil de diagnosticar como la TBM, donde el diagnóstico puede prevenir las secuelas neurológicas irreversibles que causa la enfermedad e incluso la muerte del paciente. Es la forma más grave de la enfermedad en la cual hay un número muy bajo de bacterias que no es posible detectar con los métodos tradicionales.

Con la aparición de la técnica de amplificación genética llamada reacción de la polimerasa en cadena (PCR), que permite encontrar y reproducir en grandes cantidades secuencias conocidas de ácidos nucleicos en forma rápida y sencilla.

Técnica que permitió revolucionar actuales procedimientos diagnósticos, la cual fue utilizada para llevar acabo el presente estudio.

Las pruebas de laboratorio comunes para el diagnóstico como el cultivo, la tinción y métodos serológicos presentan una baja sensibilidad en TB pulmonar y aún más baja para las formas extrapulmonares.

La técnica de PCR a pocos años de haber sido desarrollada ha tenido un gran impacto en todas las áreas ya que ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades causadas por diferentes agentes infecciosos.

En el presente trabajo se amplificó el fragmento de 123 pb de IS6110 la elección de la secuencia de IS6110 fue basada en estudios reportados por Eisenach K. y Cols amplificando un fragmento de 123 pb ya que es una secuencia multicopia dentro del cromosoma de la micobacteria, la cual se encuentra de 15 a 20 copias permitiendo iniciar con más de un molde de ADN, proporcionando una alta sensibilidad. (29)

La técnica de PCR es muy versátil para ser utilizada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y no infecciosas y es bueno considerar las ventajas y desventajas que ello implica. El PCR es una técnica que requiere de muchos cuidados para evitar contaminaciones en los reactivos y las micropipetas, además de las que se pueden dar durante la manipulación de las muestras. Para ello es necesario destinar zonas específicas de trabajo dentro del laboratorio como es para la extracción de ADN, la preparación de los reactivos, para las amplificaciones, y la electroforesis de los productos amplificados. Esto requiere tener material exclusivo para la extracción del ADN, para la preparación de los reactivos, para amplificar y para productos amplificados. Es necesario destinar material de vidrio exclusivo para ser utilizado en la preparación de las soluciones y se requiere de un gasto permanente de material de plástico como son las puntas para las micropipetas y los tubos ya que se trabaja solamente con material nuevo y esterilizado. Además el termociclador y los reactivos son costosos.

La PCR tiene sus ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico ya que es capaz de identificar la presencia de menos de 10 bacterias en una muestra y a los microorganismos no viables mediante la amplificación de su material genético. Ventaja de gran utilidad en el diagnóstico de las formas extrapulmonares difíciles de establecer y para aquellas formas en las que se encuentran un bajo número de bacterias como es el caso de la TBM ya que al ser establecido el diagnóstico de manera rápida y precisa se inicia un tratamiento oportuno y de esta manera prevenir

los daños neurologicos que ocasiona la infección. La PCR es rápida ya que es posible tener el resultado en tres días.

La técnica al amplificar el fragmento 123 pb en muestras de LCR con el METB nos proporciono una sensibilidad del 60 % y una especificidad del 77.5 % . Los cuatro falsos negativos obtenidos en este grupo control al ser analizados no muestran ninguna banda de amplificación por lo que podemos decir que probablemente las muestras no presentaban el material del METB circunstancia por la cual nos dan negativo.(Tabla 2)

Con respecto a la relación que podría existir entre M. tuberculosis y la neuropatía de SGB se llevo a cabo la prueba de la concordancia entre el diagnóstico y la PCR.

La concordancia observada (Tabla 3) fue de 40.5 % ó 0.40 por lo tanto la concordancia más allá de la casualidad es 0.2 el numerador de Kappa (k) la cual es definida como la concordancia más allá de la probabilidad dividida entre la cantidad de concordancia posible más allá de la probabilidad.

El potencial de concordancia más alla de probabilidad (1 - C) es simplemente el 80 % menos la concordancia por casualidad 0.40. Por lo tanto K es 0.2. Para lo cual Sackett, Haynes y Tugwell (1985) señalan que el grado de concordancia varía en forma considerable, fluctuando del 80 %. (43) Esto quiere decir que no hay ninguna relación entre M. tuberculosis y el Síndrome Guillaín-Barré aun teniendo estos pacientes antecedentes clínicos de contacto con esta micobacteria.

Aunque los dos positivos para la prueba de M. tuberculosis nos permiten pensar que posiblemente estos pacientes estan desarrollando la enfermedad nuevamente, pero no así que la micobacteria sea la causa de la Polineuropatía del término SGB.

Los resultados obtenidos de alguna manera son determinados por las características del gen utilizado en este trabajo que es específico del complejo de M. tuberculosis y son muy particulares. IS6110 se presenta dentro del cromosoma de M. tuberculosis en una secuencia multicopia encontrandose de 15 a 20 copias.(30-31) Esto contribuye de manera importante en proporcionar una alta sensibilidad y

estabilidad del ensayo, ya que se tiene la ventaja de partir de más de un molde de ADN para la amplificación incrementando la capacidad para detectar pequeñas cantidades de ADN.

Es interesante observar que al amplificar el fragmento de 123 pb se tiene la ventaja de que es muy sensible, pero también la desventaja de que se den fácilmente las contaminaciones entre las muestras, por lo que hay que ser muy cuidadosos. Es importante incluir en cada amplificación el control negativo de PCR, el cual consta de todos los componentes de reacción excepto el ADN que es sustituido por agua. Al ser analizado por el producto de PCR mediante la electroforesis el control negativo no debe mostrar ninguna banda de amplificación y en caso contrario, esto es indicativo de contaminación y por lo tanto los resultados no son de utilidad.

7. CONCLUSIONES.

1. La kappa (K) obtenida nos permite ver que la concordancia entre el diagnóstico y la PCR varía en forma considerable del 80%, determinando de esta manera que no hay ninguna relación entre M. tuberculosis y el Síndrome Guillain-Barré.
2. La amplificación del fragmento de 123 pb (IS6110) en muestras de líquido cefalorraquídeo proporcionó una sensibilidad del 60 % para el diagnóstico del Meloma tuberculoso y una especificidad del 77.5 %.
3. La técnica de PCR utilizada en este estudio nos permitió la detección e identificación rápida y sensible de M. tuberculosis. La detección de M. tuberculosis por PCR es útil en muestras del trato respiratorio y otras muestras clínicas. La sensibilidad y especificidad de la ampliación por PCR son las más altas.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- 1. Barranco Ruiz F., Blasco Morilla J., Merida Morales A. Infecciones agudas del Sistema Nervioso Central. Ed. Electronica**
- 2. Figueroa R. F, Hidalgo Loperena H, Sánchez. 1992. Principios de Medicina Interna. Vol. 2 Ed. Mc Graw Hill Interamericana. 2799-2803**
- 3. Lagunas R.C., Romero Z..J. 1996. Infectología. Ed. Prado. 153-154**
- 4. Academia Mexicana de Neurología A.C. amn@glw.com.mx**
- 5. Harrison. 1998. Principios de Medicina Interna. Vol. 1 Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. pp. 1154**
- 6. Harrison. 1994. Principios de Medicina Interna. Vol. 1 y 2 Ed. Mc Graw Hill Interamericana. 792-794 y 830-831**
- 7. Pacheco R.C . García G.M.L., Giono C.S., Escobar G.A y Valdespino G.J.L., 1994 Tuberculosis en adultos. Enfermedades respiratorias agudas y cronicas. Ed. INDRE, Secretaria de Salud. México. 211-249**
- 8. Stites D., Stobo J., Fudenberg H. & Wells V.1985 Inmunología básica y clínica. 5a edición, Ed. El manual moderno, México. pp 632-635**

- 9. Pacheco R.C., Vázquez R.V. y Badillo N., Escobar G.A.,Valdespino G.J.L. y Selpúveda A.J. 1992. Vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) en vacunas. Ciencias y Salud., Ed, INDRE., Secretaria de Salud, México. 187-198**

- 10. Balandrano C.S. García G. M.L., Giono C.S., Pacheco C.R., Escobar G.A., Valdespino G.J.L.1994. Micobacterias en enfermedades respiratorias agudas y crónicas. INDRE, Secretaría de Salud, México. 517-526**

- 11. Herrera B Teresa. 1998. Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el Diagnóstico de la Tuberculosis. Facultad de Ciencias. México D.F., 2-68**

- 12. Erlich Henry A. 1989. PCR Technology. Principles and Application. Ed. M. Stockton Press. 1-30**

- 13. Salber Mills Ho y Trunkey. 1987. Diagnóstico y Tratamiento de urgencias. Ed. El Manual Moderno. pp 142**

- 14. Wolinsky E. Mycobacteria In Microbiology 3a Edición, Davis B., Dulbecco R., Eisen H. & Ginsberg H. Ed Harper & Row Publishers, U.S.A., 724-735**

- 15. Romero C. R. Microbiología y parasitología humana. Bases Etiológicas de las enfermedades infecciosas. Ed Médica Panamericana, México, 1993, 323-328**

- 16. Ian M.Orme and Andrea M. Cooper. 1999. To Tuberculosis. Elsevier Science. Vol. 20. No. 7 pp. 307-311.**

- 17. Farga C Victorino. 1992. Tuberculosis. Ed. Mediterráneo. 17-41.**

- 18. Stites Daniel P., Terr Abba I. y Parslow Tristram G.. 1997. Inmunología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno México 1985. 258-265**
- 19. Ravigione C., Snider D. & Kochi A. 1995. Global epidemiology of tuberculosis Morbidity and mortality of worldwide epidemic. J.A.M.A.; 273:220-226**
- 20. Grupo de trabajo sobre tuberculosis. Consejo Nacional para el Control de la Tuberculosis en España. Med. Clin (Barc) 1992; 98:24-31**
- 21. American Thoracic Society. Treatment of tuberculosis and infection in adults and childrens. Am J Respir Crit Care Med 1994; 149:1.359-1.374.**
- 22. Ausina V, Manterola JM, Gamboa F. Técnicas rápidas de Diagnóstico de la tuberculosis. Jano 1996; 1.154:404-414**
- 23. Rom WN, Garay S. Tuberculosis. Litle, Brown and Company (eds) Boston. 1996.**
- 24. Iseman MD. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. N Engl J Med 1993; 329: 784-791**
- 25. Frieden TR. Clinical policies and protocols. Chest clinics bureau of tuberculosis control. New York city department of health. URL <http://www.cpmc.columbia.edu/tbc.pp/cover.htm/> 1994**

- 26.** David H. Persing; Thomas F. Smith., Fred C. Tenover., and Thomas J. White. 1993. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Editorial. American Society for Microbiology. 1|91-196.
- 27.** Sada D.E., Torres R.M.,& Herrera B.T. 1998. Nuevos métodos de diagnóstico en tuberculosis. Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex., 1:121-125
- 28.** Sjobring u., Mecklenburg M., Andersen A. & Mioner H. 1990. Polymerase Chain Reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis. J.Clin. Pathol.;46:318-322
- 29.** Thierry D., Cave M., Eisenach K D., Crawford J., Bates J., Gicquel B. & Guedson J. 1990. IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex. Nucleic. Acids. Res.;18:188
- 30.** Hance. A.J., Grandchamp. B., Frébault-Levy.V., Lecossier D., Rauzier J., Bocart D. and Gicquel B. 1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Molecular Microbiology. 3:843-849
- 31.** Eisenach K D., Cave M D., Bates J., & Crawford J. 1990. Polymerase Chain Reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis. J.Infect. Dis.; 161,977-981
- 32.** Eisenach K., Sifford M., Cave D., Bates J. & Crawford J. 1991. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase Chain Reaction . Am. Rev. Res. Dis.; 144:1160-1163

- 33.** Godfrey Faussett P., Wilkins E., Khoo S. & Stoker N, 1991. Tuberculous pericarditis confirmed by DNA amplification. *Lancet*; 337: 176-177
- 34.** Schluger N., Condos R., Lewis S. & Rom W. 1994. Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet*; 344: 232-233
- 35.** Noel A.B., Lecossier D., Nassif X., Gicquel B., Frebault L.V., and Hance A.J. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis of mycobacterial DNA in clinical samples. *The Lancet*. 1069-1071
- 36.** Innis Michael A., Gelfand David H., Sninsky John J., and White Thomas J. 1990. PCR Protocols. A guide to Methods and Applications. Editorial. Academic Press. 3-27.
- 37.** Rich E. A. & Ellner J.J. 1980. Pathogenesis of tuberculosis. In tuberculosis. Current and Treatment. Friedman L.N. ed. CRC Press, U.S.A., 724-735
- 38.** Nava F. M. y Santos P.J.I. 1994. Tuberculosis en niños. En *Enfermedades Respiratorias Agudas y Crónicas*. Ed. INDRE, Secretaria de Salud, México. 187-210
- 39.** Kochi A. 1991 The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World health organization. *Tubercle Lung Dis.*; 72:1-6
- 40.** Enarson D. 1995., The international union against tuberculosis and lung disease model national tuberculosis programmes . *Tubercle Lung Dis.*; 76:95-99.

41. Shinnick T. & Good R. 1995. Diagnostic Mycobacteriology Laboratory Practices. Clin. Inf. Dis.; 21:291-299.

42. Dawson-Saunders B. & Trapp R.G. 1993. Bioestadística Médica. Ed. Manual Moderno. México D.F. pp. 384

9. APÉNDICE.

1. Solución amortiguadora TBE 10X pH= 8.3 para electroforesis.

Tris 890 mM Boratos 890 mM EDTA 20 mM

EDTA (sigma)----- 7.4 g

Trizma base (sigma)----- 108 g

Ácido Bórico (sigma) ----- 55 g

Agua cbp ----- 1000 ml

Ajustar el pH 8.3 antes de aforar. Filtrar la solución, utilizando una membrana de 0.45 μ m de diámetro y conservarla a temperatura ambiente.

2. Cloroformo Alcohol Isoamilico. (49:1) para 100 ml

Cloroformo (Baker)-----98 ml

Alcohol Isoamilico (Baker)----- 2 ml

Guardar en frasco ámbar a 4°C.

3. Acetato de Sodio 3M, pH= 5.2

Acetato de Sodio (Sigma)----- 24.6 g

Agua cbp----- 100 ml

Ajustar el pH con ácido acético glacial antes de aforar. Esterilizar en autoclave y hacer alícuotas de 1 ml. Conservarlas a -20°C.

4. Solución de corrida para electroforesis.

Para 10 ml:

Azul de bromofenol (Sigma)——— 0.025 g

Xylene cyanole (Biorad)——— 0.025 g

Glicerol (Merck)————— 3.0 ml

Agua cbp————— 10 ml

Mezclar bien y filtrar utilizando membrana de 0.45 μ m; hacer alícuotas y conservarlas a 4°C.

5. Tris 1 M, pH = 8.0

Mezclar:

Tris (Sigma)————— 12.1 g

Agua cbp————— 100 ml

Esterilizar en autoclave y hacer alícuotas. Conservar a 4°C.