



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

**UTILIDAD DE LA REACCION EN CADENA DE POLIMERASA EN
EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR EN
PACIENTES CON BACILOSCOPIA NEGATIVA EN
EXPECTORACIÓN**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO EN
NEUMOLOGIA**

P R E S E N T A:

DR HERMENEGILDO REYES CALDERÓN

**TUTORA.
DRA. RENATA BAEZ SALDAÑA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE FORMACION DE PERSONAL DE SALUD**

MÉXICO, DF. AGOSTO 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

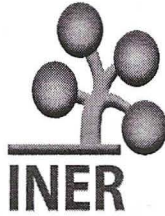


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



**UTILIDAD DE LA REACCION EN CADENA DE
POLIMERASA, EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS
PULMONAR EN PACIENTES CON BACILOSCOPIA
NEGATIVA EN EXPECTORACIÓN**

AUTORES

**DR. HERMENEGILDO REYES CALDERON
RESIDENTE DEL TERCER AÑO DE NEUMOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

TUTORA

**DRA. RENATA BAEZ SALDAÑA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE FORMACION DE PERSONAL DE SALUD**

INER

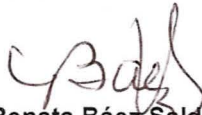
**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
DIRECCION DE ENSEÑANZA**



Dr. José de Jesús Villalpando Casas
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Dr. Jorge Salas Hernández
Subdirector de Enseñanza
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Dr. María Sonia Meza Vargas
Profesora Titular del Curso de Neumología
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias



Dra. Renata Báez Saldaña
Tutor de Tesis
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme lograr mis objetivos en la vida

A mis Padres por haberme dado la oportunidad de ser un profesional, por la educación, los valores, el amor y el cariño incondicional y sincero entrañablemente gracias.

A ti Susana por el amor tan grande, que en ocasiones no he sabido apreciar, a mi Hija Nelly la luz de mi vida

A mis hermanos Andrés, Pedro, Judith Luz Maria con cariño por ser lo máximo un ejemplo para mí.

A la Dra. Báez por su valiosa e invaluable ayuda por que sin su ayuda no hubiese podido terminar la presente, le agradezco todas sus enseñanzas.

INDICE

1	INTRODUCCION	7
2	JUSTIFICACION	17
3	HIPOTESIS	18
4	OBJETIVO	18
5	MATERIAL Y MÉTODOS	19
6	RESULTADOS	21
7	DISCUSIÓN	24
8	CONCLUSIONES	30
9	REFERENCIAS	31
10	TABLAS Y GRAFICAS	36

INTRODUCCION

Epidemiología

La Tuberculosis Pulmonar es una de las enfermedades más antiguas y que mayor número de muertes ha ocasionado. Se estima que existen aproximadamente unos 1700 millones de infectados en el mundo, lo que equivale aproximadamente a la tercera parte de la población mundial, y cuyo reservorio condiciona una incidencia anual entre 8 y 10 millones de casos nuevos de enfermedad con una prevalencia estimada de 16 a 20 millones de habitantes (1). En los últimos años se han realizado estudios de índole epidemiológico con respecto a esta enfermedad infecciosa, en Europa por ejemplo, se ha observado un incremento en la incidencia de esta patología ocasionando 41.3 casos por 100,000 personas, de edades entre los 25 y 45 años. Entre los factores más importantes para explicar esta tendencia epidemiológica son la migración y el incremento en la epidemia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (2, 3). Según el último informe de marzo de 2007 por el centro de control de enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica, en 2006 se consideraron 13767 casos de Tuberculosis, para una tasa de 4.6 por cada 100,000 habitantes, estimando 124 casos de farmacorresistencia, por lo que los lineamientos de este centro recomiendan dar tratamiento para Tuberculosis en pacientes con infección del Virus de Inmunodeficiencia Humana (4).

La mortalidad de Tuberculosis Pulmonar es de aproximadamente 2 millones al año en todo el mundo y constituye una de las causas más comunes de muerte en patologías infecciosas (5).

La tasa de incremento de casos nuevos de Tuberculosis Pulmonar es de 0.6 a 1.8 % por año en países de Asia, África y Sudamérica (6).

La transmisión de *Mycobacterium tuberculosis* es un claro ejemplo de infección adquirida por vía aérea, en casi todos los casos la infección se adquiere por la inhalación de bacilos tuberculosos contenidos en pequeñas partículas de 1 a 5 micras capaces de alcanzar los alvéolos (7). El potencial de infección de un paciente con Tuberculosis depende fundamentalmente de 4 factores: 1) gravedad y frecuencia de la tos (8), 2) características y volumen de las secreciones, 3) número de bacilos de la fuente de infección (pacientes con baciloscopía positiva) (9) y 4) el tratamiento antituberculosis que después de dos semanas de su administración, disminuye la población bacilar en aproximadamente 99% (10).

Existen además otras formas de transmisión como la digestiva, en patógenos como: *Mycobacterium Bovis* y *Avium intracelular* (11).

Fisiopatología.

La infección de *M. tuberculosis* desencadena una respuesta inmunitaria mediada por células que se desarrolla en un tiempo que oscila entre 2 y 10 semanas, que se hace evidente por la aparición de una reacción positiva a tuberculina. De manera primaria los macrófagos y linfocitos T consiguen, en la mayoría de los casos, detener la multiplicación de los bacilos; esta inmunidad será insuficiente para impedir el desarrollo de la enfermedad y se producirá la denominada

Tuberculosis primaria en aproximadamente 5% de los casos. Otras infecciones como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, la silicosis, la Diabetes Mellitus y los fármacos inmunosupresores, incrementan el porcentaje de infección (12).

En la actualidad, con el advenimiento de la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida, su importancia como patógeno oportunista se ha incrementado considerablemente entre un 60 a 80%(13).

Diagnóstico Clínico.

Las manifestaciones clínicas de la Tuberculosis Pulmonar no permiten diferenciarla con precisión de otras enfermedades broncopulmonares. El comienzo suele ser insidioso y poco alarmante, por lo que pueden pasar varios meses hasta realizar un diagnóstico de certeza. En el adulto los síntomas son tos, expectoración mucopurulenta, diaforesis nocturna, cansancio fácil, el inicio es súbito con fiebre alta, escalofríos, expectoración hemoptoica o hemoptisis franca; a veces se realiza el diagnóstico sin concordancia con la sintomatología (14).

Los pacientes con inmunosupresion por la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana presentan un cuadro clínico más inespecífico, en el que predominan síntomas generales como fiebre nocturna, astenia, pérdida de peso y adenopatías periféricas (15).

Diagnóstico Radiográfico.

En sujetos inmunocompetentes la radiografía de tórax es una técnica muy sensible para el diagnóstico de Tuberculosis pulmonar pero poco especifica ya que

no hay un signo patognomónico por muy sugestivo que parezca. Las lesiones que se pueden observar son las siguientes: consolidación pulmonar, adenopatías generalmente unilaterales, cavitación, derrame pleural más frecuente en jóvenes y adolescentes e incluso atelectasias de determinados lóbulos por compresión de adenopatías mediastínicas. Por otra parte, no se debe considerar como método de respuesta al tratamiento ya que los cambios por imagen pueden producirse entre 3 y 9 meses posterior al mismo (16).

Diagnóstico Microbiológico.

El diagnóstico microbiológico incluye la toma adecuada de muestras mediante supervisión estricta para no realizar obtención errónea como lo serían saliva o secreción rinofaríngea. Los métodos para la obtención de muestras respiratorias es mediante expectoración espontánea o inducida después de la inhalación con nebulizaciones con solución fisiológica para la estimulación óptima, depositándose en frascos limpios y con tapa, así como muestras seriadas para mayor rentabilidad y confiabilidad. En ocasiones la broncoscopía es necesaria para lavados broncoalveolares y biopsias de lesiones sospechosas de Tuberculosis. El diagnóstico microbiológico se realiza con tinción directa de la expectoración mediante técnica de Ziehl- Neelsen y el aislamiento obligado de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el medio de cultivo tradicional denominado Löwenstein Jensen o Bactec entre otros (17).

Baciloscopía.

Se deben tomar algunas consideraciones para hacer un adecuado diagnóstico microbiológico, como la propiedad ácido alcohol resistente, que es común a todas las especies del género *Mycobacterium* entre otras. La baciloscopía negativa no descarta la posibilidad diagnóstica; ya que su sensibilidad es limitada. Se estima que la concentración más baja de microorganismos que se puede detectar mediante el examen microscópico es de 5000 a 10000 bacilos por ml. Habitualmente los pacientes suelen negativizar la muestra de 2 a 3 semanas con tratamiento antituberculosis aunque también se puede dar los falsos positivos de la baciloscopía, es decir, identifica *Mycobacterium* pero no necesariamente tuberculosis (18).

Cultivo.

Los cultivos para aislamiento de *Mycobacterium* han mejorado con el desarrollo de nuevas técnicas, para tratar de reducir el tiempo de espera del diagnóstico. Es el único método que puede asegurar un diagnóstico de certeza, además de estar validado para dar seguimiento y asegurar la cura. Presenta ventajas, como el ser más sensible que las baciloscopías, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por centímetro cúbico de muestra. El aislamiento del cultivo puro puede identificar la especie de *Mycobacterium*, asegura negativización y curación del paciente. Sin embargo, también tiene limitaciones, como la lenta capacidad de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, entre 4 a 6 semanas. El costo es superior al de la Baciloscopía y en ocasiones poco accesible en un primer nivel de atención.

Los medios de cultivo tradicionales siempre se han realizado en medios sólidos como Löwenstein Jensen, utilizando como base huevo en su fabricación, y los realizados en agar como: 7H10 y 7H11 como el de Middlebrook.

La existencia de otros medios de cultivo líquidos como los radiométricos (Sistemas Bactec) que identifican automáticamente el crecimiento micobacteriano midiendo la cantidad de CO₂ producido por el metabolismo de ácidos grasos marcados con carbono, permitiendo un ahorro entre 15 y 20 días en el diagnóstico; y los no radiométricos (MGIT: *Mycobacteria* Growth Indicator Tube System), Bactec 9000 MB System, ESP Culture System II-Myco y sistema MB-BacT *Mycobacteria* detection están basados principalmente en el marcaje con rutenio que emite fluorescencia detectable a medida que disminuye la presión parcial de oxígeno del medio como consecuencia del metabolismo microbiano. Algunos cultivos requieren enriquecimiento con sustratos como hemina, sangre micobactina o citrato de amnio férrico para la identificación de otras micobacterias como *M. Haemophilum*, *M. Malmöense*, *M. Genavense*, *M. avium*, (19).

Anatomía Patológica.

El diagnóstico anatomopatológico en ocasiones se realiza mediante la demostración de granulomas tuberculosos en muestras de tejido histopatológico como biopsia bronquial, pulmonar, transbronquial, pulmonar por toracotomía, ganglionar, de médula ósea en caso de difícil identificación del patógeno, en diseminaciones hematógenas, localizaciones extrapulmonares, granulomas caseificantes mediante tinción de Kinyoun para identificar los bacilos ácido alcohol resistentes (20).

Nuevas herramientas diagnósticas mediante Biología Molecular.

Las primeras pruebas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se realizaron con amplificación de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*. La primera secuencia I (5'GACACCTCATCGGCACCCGC3') J(5'GCCATGCGATGTCATAAG3') amplificando hasta 150 pares de bases del microorganismo (21).

La prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se ha usado por su poder discriminativo en el estudio de polimorfismo de restricción-hibridación, utilizando la secuencia de inserción IS6110, con un protocolo estandarizado que permite comparar los resultados entre distintos laboratorios y establecer bancos de datos a gran escala. El genoma de *M tuberculosis* contiene un elevado número de copias de IS6110 entre 5 y 20, localizadas en posiciones variables a lo largo del cromosoma debido a su capacidad de transposición, por ello las cepas no relacionadas epidemiológicamente presentan patrones de restricción-hibridación propios y por lo tanto, un elevado grado de polimorfismo, de manera contrastante las cepas relacionadas muestran patrones idénticos, pudiendo establecerse fácilmente una relación de clonalidad (22).

La Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa se ha comparado como técnica diagnóstica con el Adenosin Desaminasa; además, comparada histopatológicamente en el estudio de Linfadenitis tuberculosa, que es la más común de las formas extrapulmonares de *Mycobacterium tuberculosis*, con una incidencia de 30 a 52% de diagnósticos en linfadenopatía. Mediante biopsia por aspiración con aguja fina contra biopsia escisional, la sensibilidad de la prueba es del 89% y la especificidad se mostró cercana al 98% (23).

En el pasado la Reacción en Cadena de Polimerasa, ha sido utilizada para la identificación de secuencias genómicas, de un muy variado número de microorganismos, a través de fluidos y tejidos, incluyendo de manera rutinaria el examen histopatológico teniendo como principal inconveniente la fijación, que reduce la eficiencia en la extracción y la integridad de ácidos nucleicos (24).

Actualmente se han descrito muchas otras técnicas como las bandas magnéticas, que es la separación de las secuencias de DNA; demostró ser seguro y no requiere laboratorios especializados ni capacitación de alto nivel tecnológico para llevar a buen término la prueba con fines diagnósticos (25).

Esta prueba ha sido una herramienta muy valiosa sobre todo para la identificación de microorganismos patógenos, como en el caso de la *Mycobacterium tuberculosis* mediante la identificación DNA en la inserción del elemento IS6110, el cual puede codificar diferentes copias de material genético del microorganismo (26).

Las diferentes especies de *Mycobacterium tuberculosis* han sido motivo de estudio, hasta en un 99.99 % identificando los nucleótidos, como las secuencias idénticas de Ácido ribonucleico ribosomal en su fragmento 16 S (27).

La correlación realizada entre la secuencia específica de tipo genómica del bacilo de Koch, y el diagnóstico de sospecha de Tuberculosis clínica proporciona una elevada sensibilidad y especificidad de alrededor de 60 y 100 % respectivamente, mediante la proteína de inserción IS6110 tanto para detección de infección pulmonar y extrapulmonar (28).

Diversos estudios muestran la asociación encontrada entre el genotipo y fenotipo de *Mycobacterium tuberculosis* en el ser humano, primero como un agente

cosmopolita, en la transmisión de linaje filogeográfica, de la tuberculosis, entre los diferentes grupos étnicos. Como por ejemplo, grupos étnicos de china, ubicados en San Francisco es mas fácil el adquirir y desarrollar Tuberculosis pulmonar de la sepa del este de Asia (29).

La determinación de la secuencia geonómica de la tuberculosis ha permitido el descubrimiento de ciertas variables bacteriológicas, una línea en particular de bases moleculares de atenuación del bacilo de Calmette- Guerin como *M. bovis*, probado en vacunas de más de 3.5 billones de dosis (30).

Aunque el estándar de oro para la detección de tuberculosis pulmonar es el cultivo, en ocasiones se pueden ver contaminados con otras especies de *Mycobacterium*, por lo que se desarrollaron nuevas técnicas diagnósticas como la prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) que es una técnica de amplificación de ácido desoxirribonucleico en diferentes regiones del genoma de la *Mycobacterium tuberculosis*; la sensibilidad y especificidad son altas, por lo que la prueba es de utilidad como prueba diagnóstica de la Tuberculosis Pulmonar (31).

Cerca del 5% de los cultivos para la detección de Tuberculosis Pulmonar, se encuentran contaminados, por lo que se deben contemplar otros métodos diagnósticos como la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) la cual se realiza mediante extracción de una porción del cultivo amplificando su material genómico, ácido desoxirribonucleico (ADN) (32).

La Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa se conoce desde hace más de 10 años, se ha probado en el diagnóstico de nódulo pulmonar solitario, en tejido

obtenido por aspiración con aguja fina a través de tomografía computada como diagnóstico diferencial en patología no pulmonar (33).

La Reacción en Cadena de Polimerasa se ha utilizado en secreción bronquial, líquido pleural, para infección por *Mycobacterium Tuberculosis* como una herramienta valiosa para aislamiento del bacilo en infecciones extrapulmonares (34).

El diagnóstico preciso rápido y dinámico de la Tuberculosis Pulmonar se puede hacer mediante baciloscopia en expectoración, que en el caso de ser positiva, proporciona elementos para un diagnóstico presuncional y obliga a indicar tratamiento de forma inmediata, sin embargo en los casos de tuberculosis extrapulmonar que generalmente albergan una población bacilar baja, difícilmente se observan baciloscopías positivas, lo que constituye un problema importante ya que eleva costos, días de estancia intrahospitalaria, retraso en el tratamiento oportuno de pacientes potencialmente infectocontagiosos, todo esto debido a que la prueba estándar de oro de esta patología es el Cultivo y aislamiento de *Mycobacterium Tuberculosis*, mismo que lleva aproximadamente 8 a 12 semanas, ya que es un bacilo de difícil crecimiento y que requiere ciertas condiciones de temperatura, así como de enriquecimiento del cultivo para su óptimo desarrollo, es por eso que se trata de realizar el presente estudio, colocando a la Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa como una herramienta diagnóstica, basada en la secuencia de inserción de IS6110 en el lavado bronquioalveolar en pacientes con sospecha de Tuberculosis pulmonar, previa baciloscopia negativa, como alternativa en el diagnóstico de Tuberculosis Pulmonar.

JUSTIFICACIÓN

El advenimiento de casos nuevos de Tuberculosis pulmonar nos lleva también a un nuevo reto el diagnóstico rápido y oportuno, mediante nuevas técnicas como la Biología Molecular entre la que se encuentra la prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa más rápida que el cultivo.

Aunque el cultivo sigue siendo el estándar de oro, es una prueba que requiere de por lo menos 6 a 8 semanas para poder obtener resultados adecuados; la PCR es una técnica de amplificación de secuencias de material genético para identificación de *M. Tuberculosis*, reduciendo el tiempo de espera de resultados, con una sensibilidad del 80% y especificidad del 100% ,con un Valor Predictivo Positivo y Negativo elevado por lo que se justifica su estudio y evaluación en este Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, ya que actualmente se dispone de esta herramienta diagnóstica para la Tuberculosis Pulmonar. La evaluación clínica de la Reacción de Cadena de Polimerasa en el diagnóstico de Tuberculosis Pulmonar como prueba rápida, tanto en localización clásica y extrapulmonar, muestran una sensibilidad de 75.9% y 81.3% para la prueba estándar de oro es decir el cultivo. La genética muestra una faceta nueva en la Tuberculosis pulmonar, para la comunidad médica, buscando la filogenética en *Mycobacterium Tuberculosis* aislada en restos fósiles de bisonte de Norteamérica, de más de 17000 años antes de nuestra época, por lo que es de esperarse la asociación de diferentes linajes de la *Mycobacterium*, a la par de diversos genotipos de la Tuberculosis (35).

HIPÓTESIS

El desempeño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en lavado broncoalveolar para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, en pacientes con sospecha clínica de tuberculosis y baciloscopía negativa en expectoración, será al menos semejante a lo informado en la literatura.

OBJETIVO

1.- Determinar el desempeño de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en lavado broncoalveolar para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, en pacientes con sospecha clínica de tuberculosis y baciloscopía negativa en expectoración.

MATERIAL Y MÉTODOS

La base de datos del presente estudio derivó de los pacientes que formaron parte del protocolo de doctorado a cargo de la Dra. Renata Báez Saldaña, inicialmente bajo la asesoría del Dr. Eduardo Sada Díaz, y posteriormente por el Dr. Julio Granados Arriola, dicho protocolo relacionado con la susceptibilidad genética a la tuberculosis en población mexicana y que fue aprobado en su momento por el comité de ciencia de esta Institución, se llevó a cabo en pacientes que ingresaron al servicio de hospitalización del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias durante los años 2001 y 2002.

Los criterios de inclusión al presente trabajo fueron pacientes con sospecha clínica alta y baja de tuberculosis pulmonar con baciloscopía negativa en expectoración y que a juicio del médico tratante solicitó la realización de fibrobroncoscopía para toma de muestras de lavado y cepillado bronquial y realización de biopsias bronquiales si así lo ameritaba el caso. La fibrobroncoscopía se realizó por los médicos adscritos al servicio con la participación de médicos residentes en formación supervisados por los médicos adscritos. El lavado broncoalveolar se realiza de preferencia en el sitio anatómico afectado, o si el daño pulmonar es difuso se realiza en lóbulo medio o llingula por su fácil recuperación. El procedimiento consiste en instilar entre 150 y 300 ml de sol salina a temperatura ambiente tratando de recuperar por lo menos el 80% de la cantidad instilada. Las muestras de lavado y cepillado bronquial se procesaron para estudio citológico, y cuando hubo biopsias disponibles, para

diagnóstico histopatológico. Se logro el diagnóstico definitivo en todos los casos dependiendo de la patología.

Una porción del lavado bronquial se sometió a cultivo para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* mediante método líquido y sólido (ESP-Myco y Lowenstein Jensen), así mismo y en paralelo se practicó la amplificación del fragmento de 123 pares de bases de la secuencia de inserción de IS6110 del complejo de *Mycobacterium Tuberculosis* por reacción en cadena de Polimerasa en el laboratorio de investigación en Microbiología, para ello se utilizo 1 ml de Lavado broncoalveolar mismo que se concentró por centrifugación a 14000 rpm se digirió con solución de lisis (proteínasa K 2%) y se extrajo con Cloroformo – Alcohol Isoamílico con una dilución de 49:1 . El ácido Desoxirribonucleico se precipitó con ETOH- Acetato de sodio, se secó a 60 gc, y se disolvió en agua. La Secuencia de Inserción se amplificó utilizando los siguientes iniciadores CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG, CTCGTCCAGCGCGCTTCGG.

El producto de la Reacción en Cadena de Polimerasa se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Se estudiaron variables Sociodemográficas: género, edad, historia de tabaquismo. Clínicas: síntomas generales como tos, disnea sibilancias hemoptisis; Radiológicas como: patrón intersticial, consolidación, cicatriz (hallazgos de fibrosis cicatrizal, cavitación derrame pleural, calcificación, atelectasia y hallazgos sugestivos de bronquiectasias. Igualmente se obtuvieron los diagnósticos definitivos de 43 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. El cultivo para *Mycobacterium Tuberculosis* se consideró como la prueba diagnóstica estándar de oro en nuestro estudio.

ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó estadística descriptiva de acuerdo a la naturaleza de cada variable.

Para medir el desempeño de la prueba de PCR en este grupo de pacientes se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivo positivo y negativo y razones de verosimilitud mediante tablas de contingencias 2x2. (Tabla 1)

RESULTADOS

Se estudiaron de manera sistemática un total de 43 pacientes de los cuales 23 pacientes fueron del género masculino, con un porcentaje de 53%, 20 del sexo femenino para un porcentaje de 47 %, con promedio de edad de 46+- 17 años, con edades entre 13 y 87 años respectivamente. (Tabla 2). Del total de 43 pacientes participantes se realizaron baciloscopías en serie de tres todas negativas. Se describieron 16 (26.8 %) casos con Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa positiva y 27 (73.2%) casos con resultado negativo.

De 16 pacientes con sospecha clínica de Tuberculosis, la prueba fue positiva en 10(63%) casos y de 6 pacientes con historia de Tuberculosis Pulmonar solo en uno (20%) la Reacción en Cadena de Polimerasa fue positiva confirmada por cultivo. (Tabla 3). La sensibilidad y especificidad resultaron en 60 y 70% respectivamente, los valores Predictivo positivo y negativo fueron de 38% y 85% respectivamente, y las razones de verosimilitud positiva y negativa 1.8 y 0.60 respectivamente (Tabla 4).

Cabe mencionar que del total de los 43 pacientes estudiados se realizaron diagnósticos finales con PCR positiva un total de 16 pacientes de los cuales

Tuberculosis pulmonar en 10 pacientes que corresponde al 63% , en otros diagnósticos patología intersticial 3(19%) pacientes, Neumonía 1 paciente (6%) Cáncer 1paciente (6%) Nódulo pulmonar solitario 1 paciente (6%) (Tabla 5)

Entre las otras variables utilizadas se menciona hallazgos radiográficos como patrón intersticial, consolidación, cicatriz, cavitación, derrame pleural, calcificación, atelectasia y bronquiectasias. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. (Tabla 6)

En relación a la sintomatología clínica, la tos se documentó en todos los pacientes, la disnea en 14, sibilancias en 3 y hemoptisis 1. (Tabla 7)

Los Diagnósticos finales de los 43 pacientes fueron: tuberculosis en 20(46%) pacientes, Neumopatía intersticial difusa 8,(18%) Neumonía 4 (9%), Cáncer 2 (1%), Nódulo pulmonar solitario 2 (4%), otros 7 (16%), (Figura 1)

TABLA 1.

TABLA DE CONTINGENCIA 2x2

TABLA DE CONTINGENCIA		Prueba estándar de oro (Cultivo para MTB)	
		Positivo	Negativo
PCR	Positivo	a VP	b FP
	Negativo	c FN	d VN

Sensibilidad.- $a / (a+c)$

Especificidad.- $d/(b+d)$

Valor Predictivo Positivo.- $a / (a+b)$

Valor Predictivo Negativo $d / (c+d)$ (37)

Razón de verosimilitud += sensibilidad / (1- especificidad)

Razón de verosimilitud - = 1- sensibilidad/ especificidad

CONCLUSIONES

Las pruebas de amplificación de DNA como Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa se han convertido en una valiosa herramienta diagnóstica para los casos de tuberculosis extrapulmonar que se caracterizan por presentar una población bacilar baja y en los casos de baciloscopía positiva, para identificar M. Tuberculosis y distinguirla de las micobacterias no tuberculosas.

De acuerdo al desempeño de la prueba que mostró sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y razón de verosimilitud bajas, su utilidad es cuestionable, sin embargo de acuerdo al resultado tanto del valor predictivo negativo, resulta útil debido a que con un resultado negativo, la probabilidad de que el paciente no tenga tuberculosis es del 85%.

REFERENCIAS

- 1.- Murray JF. Un programa mundial contra la tuberculosis emerge: agenda de investigaciones, incluyendo el impacto de la infección VIH. *Bol Union Int Tuberc Enf Resp* 1991; 66: 229-231.
- 2.- O'Brien R J, Geiter L J, Snider D E. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Result from a national survey. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1007-1014.
- 3.- Sarah R Anderson, Helen Maguire, and Jacqui Carless Tuberculosis in London: a decade and a half of no decline *Thorax* 2007; 62: 162-167
- 4.- R Pratt, V Robison, T Navin, Div of TB Elimination, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention (proposed); M Hlavsa, E Pevzner, EIS officers, CDC. *JAMA*, April 25, 2007—Vol 297, No. 16 1764- 1767
- 5.-Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, et al. Tuberculosis. *Lancet* 2003; 362:887–899
- 6.- Gopi PG, Subramani R, Santha T, et al. Relationship of ARTI to incidence and prevalence of tuberculosis in a district of south India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10:115–117
- 7.- American Thoracic Society. Mycobacterioses and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 492-496.
- 8.-. American Thoracic Society. Diagnosis and Treatment of disease caused by nontuberculous Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 940-953.
- 9.-. O'Brien R J, Geiter L J, Snider D E. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Result from a national survey. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1007-1014.
- 10.- Khan MA, Kornat DM, Bachus B et al. Clinical and Roentgenographic spectrum of pulmonary tuberculosis in the adult. *Am J Med* 1977; 62: 31-38.

- 11.- Chaison RE, Sloutkin G. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1989; 159: 96-100.
- 12 Eisenach KD, Cave MD, Bates JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 160:977–981
- 13.- Itoh A, Yamaguchi E, Kuzumaki N, et al. Expression of granulocyte macrophage colony-stimulating factor mRNA by inflammatory cells in the sarcoid lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:245-9. Bibliographic Links
- 14-López Facal P. Técnicas de imagen en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. En: *Tuberculosis*. Caminero Luna JA, ed. Madrid: Gráficas Letra S.A. 1992; 87-104.
- 15.-Tony JC. Impact of basic research on tomorrow's medicine: applications and limitations of polymerase chain reaction amplification. *Chest* 1995; 108:1393–1404
- 16.-Kox LFF. Tests for detection and identification of mycobacteria: how should they be used?. *Respir Med*. 1995;89:399-408. Bibliographic Links
- 17.- Hobby GL, Holman AP, Iseman MD, Jones JM. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*1973; 4: 94-104.
- 18.-Kaul M, Varma A, Tyagi JS. A highly sensitive non-radioactive method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Biochemical* 1994; 11:28–29
- 19.- Singh, Krishna K; Muralidhar, M; Kumar, Arvind; Chattopadhyaya, T K; Kapila, Kusum; Singh, Manoj K; Sharma, S K; Jain, N K; Tyagi, Jaya.-Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in granulomatous lymphadenopathy *Journal of Clinical Pathology* Volume 53(5), May 2000, pp 355-361
- 20.- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, et al. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded materials by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991;3:353-4.
- 21.-Caldarelli-Stefano, R; Vago, L; Bonetto, S; Nebuloni, M; Costanzi, G Pathology Unit, L. Sacco Hospital, Institute of Biomedical Sciences, Via GB Grassi, University of Milan, 74, 20157 Milan, ItalyC) Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* PCR *British Medical Journal* 1999. Volume 52(3), June 1999, pp 158-160

- 22.- Toru Hashimoto , Katsuhiko Suzuki et al Rapid detection of Mycobacterium Tuberculosis in sputa by the amplification of IS6110 Internal Medicine Vol. 34, No 7 (july 1995)
- 23.- Filliol L et al 2006 Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis; insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set J Bacteriol 188; 759-772.
- 24.- Eisenach KD, Siffford MD, Cave MD Bates JH Crawford JT Detection of Mycobacterium tuberculosis en sputum samples using a polimerase chain reaction. AM Rev Respir Dis 1991; 144; 1160-63
- 25.- Fleishmann ,R.D. et al 2002 Whole –genome comparison of Mycobacterium Tuberculosis clinical and laboratory strains J bacterial 184; 5479- 5490
- 26.- Behr, M A and Small PM 1999 A historical and molecular phylogeny of BCG strains Vaccine 17: 1274-1282.
- 27.- Hobby GL, Holman AP, Iseman MD, Jones JM. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother 1973; 4: 94-104.
- 28.- Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. Mycobacterium. En: Manual of Clinical Microbiology, Balows A, ed. Washington DC: American Society of Microbiology, 1991; 304-339.
- 29.- Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. Clin Microbiol Rev 5: 1-25
- 30.-. American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1990; 142:725-735
- 31.- Sauret J, Peralta E, León C et al. Biopsia pulmonar en el diagnóstico de la tuberculosis. Med Clin (Barc) 1986; 86: 215. 34.-34
- 32- Hopewell PC. Mycobacterial diseases. En: Textbook of Respiratory Medicine. Murray/Nadal, eds. Filadelfia: Saunders, 1988.1350-1358
- 33.- Clancy L. Transmisibilidad de la tuberculosis. Bol Un Intern Tuberc Enf Respir 1990; 65: 77-78.
- 34.-. Ausina V. Actualidad de la tuberculosis. Una visión crítica de las nuevas técnicas diagnósticas. Enf Infec Microbiol Clin 1992; 10: 249-254. 1912;20:146-48.

- 35.-Rotchscield BM et al Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct
binson dated 17000 años before the present Clin Int Dis 2001 33; 05-11.
- 36.- Wayne W Daniel Bioestadística base para el análisis de las ciencias
Limusa Wiley Mexico 2004 pp71- 84
- 37.- Kua Ting Liu Wei Juin Su Roury Perng Perng Clinical utility of polymerase
Chain reaction for diagnosis of smear- negative pleural tuberculosis, J Clin Med
Association April 2007 Vol 70 no 4 367-376
- 38.-Dy C Schealle S. Dulin P. Pathena V Ravigliense Consensus Statement global
burden of tuberculosis estimated incidence prevalence and mortality by country
Who Global Surveillance and monitoring project JAMA 1999 282, 677 -686.
- 39.-Heidel E Docker H Caugrant DA et al Pulmonary Tuberculosis en Norwegian
patients the role of reactivation reinfection and the primary infection assessed
polymerase phisin analysis Int J Tuberc Lung Dis 2000, 4 300- 307.
- 40.- Gyan J. R. Brouer J de Buel AS et al interpreting DNA fingerprint clusters of
Mycobacterium tuberculosis derived from DNA fingerprint techniques Am J.
Epidemiol 1999 149: 366-377.
- 41.- Joel D Ernst Graldmsn Trevejo – Nuñez and Diaz Bonarecel Genomics and
the evolution pathogenesis and diagnosis of tuberculosis The Journal of clinical
investigation vol 117, No 7 July 2007.
- 42.- Hoffner E. et al Pulmonary infect caused by less frequently encountered slow
growing environmental mycobacterium Eur J Clin Med Infect Dis 13; (937-941)
- 43.- Boddinghaus M Vincellete J. Antinozzi et al Multicenter study of a
commercial automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of
Mycobacterium an respiratory specimens in routine clinical practice Eur J Clin
Microbiology Infect Dis 2001 ; 20 ; 724-731.
- 44.- Rajalathin E. L. Ruokroneun T Kotokami H. Sintanem M.M. Nieminem
Economic evaluation of the use of PCR assay in diagnosing pulmonary
Tuberculosis in a low incidence area Eur Respir Journal 2004; 23 440-451.
- 45.- Satashi Mitarai Olshi Masashi Fukosawa, Hiroshi Yamashita Tsuoyosh
Nagatake, and Kenzo Matsumoto, Clinical evaluation of Polymerasa clinical
Reaction DNA Amplification Method for the diagnosis of pulmonary Tuberculosis
in patients with negative acid fast bacilli smear Tuhoku J Exp Med 1995; 177, 13
33.
- 46.- Yeal Kiw Chan Y. Kakan SY Cheung Sew French G.L. Diagnosis of
tuberculosis pleural efussion by the detection of tuberculosis steran acid pleural
aspirates chest 1991 100, 1261-1263.

47.- Teroyuki Takhashi an Tomohru Nakayama. Novel Technique of Quantitative Nested Real Time PCR Assay for Mycobacterium Tuberculosis DNA Journal of Clinical Microbiology March 2006 1029-1030

48 .- Mara Ang Vasconcelos Rodriguez Alvaro, Serfini Mariet de Souza Pereira et al. Standarization of in house polymerase Chain reaction for the identification of Mycobacterium Tuberculosis at thje referente Tropical Disease Hospital in the strate of Goiás Mem Onst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro Vol 99 (4) 415-419

49.- Jann-Yuan Wang Li –Na Lee, Chin- Shen Chou, Chung- Yi Huang Shu – Kuan Wang et al Performance Assesment of a Nested-PCR Assay (The rapid BAP-MTB) and the BD Probe Tec ET System for detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Especimens . Journal of Clinical Microbiology Oct 2004 p4599-4603

**TABLA 2.
DISTRIBUCION POR GÉNERO DE PRUEBA DE REACCIÓN EN
CADENA DE POLIMERASA.**

	PCR + n=16	PCR - n=27	P
Edad*	49 (27)	47 (17)	NS
Genero **			
Masculino	8	16	
Femenino	8	11	
Tabaquismo**	2(13)	6 (22)	
Total	16	27	

- *Promedio y Desviación estándar
- ** Frecuencia y Porcentajes

TABLA 3.

Tabla de Contingencia para cultivos y PCR

CULTIVOS			
		Positivo	Negativo
P C R		6	4
	Positivo	10	23
	Negativo	16	27
	Total		

Tabla 4.

Tabla de Contingencia 2x2 para Sensibilidad y Especificidad

PCR	CULTIVOS		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	VP 6 a	FP 10 b	16
NEGATIVO	FN 4 c	VN 23 d	27
	10	33	43

Sensibilidad.- $a / (a+c)$

Especificidad.- $d/(b+d)$

Valor Predictivo Positivo.- $a / (a+b)$

Valor Predictivo Negativo $d / (c+d)$

Sensibilidad : $6 / 6+4 = .6 \times 100 = 60\%$

Especificidad : $23 / 10+23 = .69 \times 100 = 70\%$

Valor Predictivo Positivo : $6 / 6+10 = .37 \times 100 = 38\%$

Valor Predictivo Negativo : $23 / 4+23 = .85 \times 100 = 85\%$

Tabla 5. Diagnósticos Definitivos de Pacientes participantes

Diagnósticos Definitivos*	PCR Positivo n=16	PCR Negativo n=27	P
Tuberculosis	10(63)	10(37)	NS
NID	3(19)	5(19)	
Neumonía	1(6)	3(11)	
Absceso pulmonar	0	1(3.7)	
Bronquiectasias	0	1(3.7)	
Cáncer	1(6)	1(3.7)	
Daño por inhalación	0	1(3.7)	
Eosinofilia Pulmonar	0	1(3.7)	
EPOC	0	1(3.7)	
TB MNT **	0	1(3.7)	
Neumonía viral	0	1(3.7)	
NPS ***	1(6)	1(3.7)	

* Frecuencias y Porcentajes

** Tuberculosis *Mycobacterium no tuberculosa*

*** Nodulo Pulomonar Solitario

Tabla 6. Hallazgos Radiológicos en los Pacientes

HALLAZGOS RADIOLÓGICOS*	PCR Positivo	PCR Negativo	P
Intersticial	6(40)	8(31)	NS
Consolidación	4(27)	6(23)	
Cicatriz	3(20)	6(23)	
Cavitación	0	2(8)	
Derrame	2(13)	0	
Calcificación	0	1(4)	
Atelectasia	0	1(4)	
Bronquiectasias	0	2(7)	

* Frecuencias y porcentajes

Tabla 7. Sintomatología clínica

SÍNTOMAS*	PCR positivo	PCR Negativo	P
Tos	16(100)	27(100)	NS
Disnea	14(88)	23(85)	
Sibilancias	3(19)	8(30)	
Hemoptisis	1(13)	6(32)	
Cultivo positivo	6(38)	4(15)	

* Frecuencias y Porcentajes

DIAGNOSTICOS FINALES

