



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

"IDENTIFICACIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA EN ESPECÍMENES DE PIEL FIJADOS EN PARAFINA QUE MOSTRARON UNA DERMATITIS GRANULOMATOSA Y DIFUSA SUGESTIVA DE TUBERCULOSIS CUTÁNEA"

**TESIS:
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN DERMATOPATOLOGÍA**

Dr. Juan Oswaldo Colmenero Mercado

**ASESOR:
Dra. Sonia Toussaint Caire
MÉDICO ADSCRITO A LA DIVISIÓN DE DERMATOLOGÍA DEPARTAMENTO DE
DERMATOPATOLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

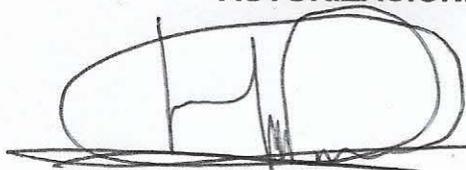
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

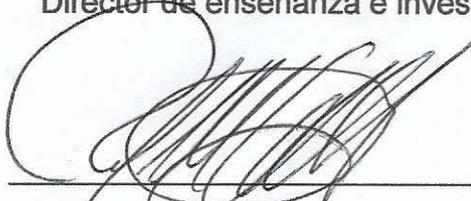
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZALEZ

AUTORIZACIONES



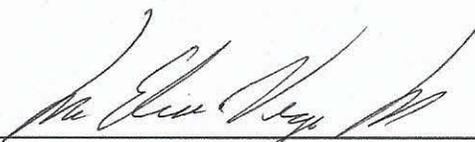
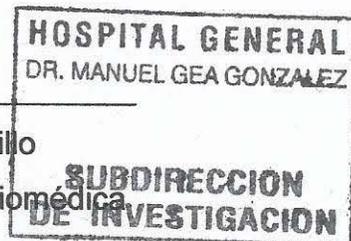
Dr. Hector Manuel Prado Calleros

Director de enseñanza e investigación



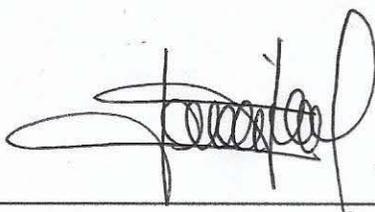
Dr. Pablo Maravilla Campillo

Subdirección de Investigación Biomédica



Dra. María Elisa Vega Memije

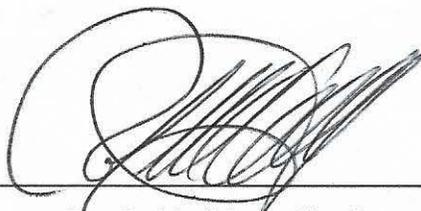
Profesor titular del curso de Dermatopatología



Dra. Sonia Toussaint Caire

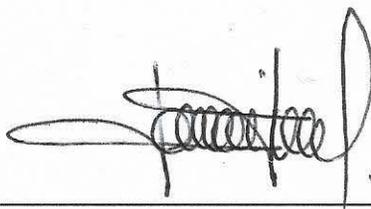
Asesora de tesis

Este trabajo de tesis con No. 06-117-2018, presentado por el alumno Juan Oswaldo Colmenero Mercado, se presenta en forma con visto bueno por el tutor principal de la tesis con fecha 6 de agosto de 2019, para su impresión final



Dr. Pablo Maravilla Campillo

Subdirección de Investigación Biomédica

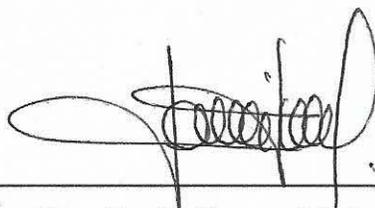


Dra. Sonia Toussaint-Caire

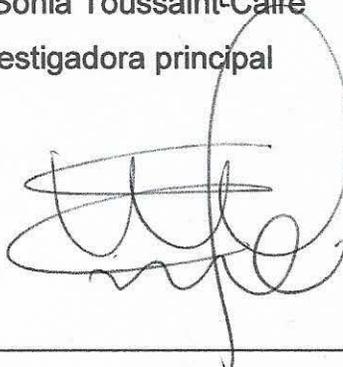
Investigadora principal

"Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* mediante Reacción en Cadena de Polimerasa, en especímenes de piel fijados en parafina que mostraron una dermatitis granulomatosa y difusa sugestiva de tuberculosis cutánea"

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González en la División de Dermatopatología bajo la dirección de la Dra. Sonia Toussaint -Caire, con el apoyo del Dr. Rigoberto Hernández Castro y la Dra. María Elisa Vega Memije, quienes orientaron y aportaron a la conclusión de este trabajo.



Dra. Sonia Toussaint-Caire
Investigadora principal



Dr. Juan Oswaldo Colmenero Mercado
Investigador asociado principal

ÍNDICE

Dedicatoria/Agradecimientos

Resumen

Introducción

Materiales y métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi mamá y a Dios.

Agradezco también a:

Dra. Ma Elisa Vega Memije

Dra. Sonia Toussaint Caire

Dr. Rigoberto Hernández Castro

Dr. Jorge Flores Ochoa

Dr. Luis Gerardo Thomassiny

Su gran apoyo y dedicación en la conclusión de este trabajo.

RESUMEN

Palabras clave: tuberculosis cutánea, reacción en cadena de polimerasa

Introducción: La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica, causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El diagnóstico puede representar un reto, debido a su naturaleza paucibacilar y distribución no uniforme de la bacteria. Se han empleado diversos métodos para su diagnóstico, como: baciloscopia, cultivo, histopatología, prueba de tuberculina, ensayos de interferón gamma (IGRAs) y Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

Material y métodos: Se realizó PCR múltiple al DNA extraído de los bloques de parafina seleccionados, que contienen los iniciadores para la amplificación de: gen 16S rRNA 5'GAGATACTCGAGTGGCGAAC 3', 5'CAACGCGACAAACCACCTAC 3' para *Mycobacterium spp*, gen rv0577 5'ATGCCCAAGAGAAGCGAATACA 3', 5'AATGTCAGCCGGTTCCGCAA 3' para *Mycobacterium tuberculosis complex* y gen RD9 5'GTGTAGGTCAGCCCCATCC 3', 5'GTAAGCGCGTGGTGTGGA 3' para *Mycobacterium tuberculosis*.

Resultados: Se incluyeron un total de 67 casos sugestivos de tuberculosis cutánea por correlación clínico-histopatológica. De los 49 especímenes de piel fijados en bloques de parafina incluidos, 14 fueron positivos para *Mycobacterium spp* mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). De los 14 casos mencionados, 4 fueron positivos para *M. tuberculosis complex* y de estos 3 fueron positivos para *Mycobacterium tuberculosis* específicamente. Lo cual representa el 4.6% de las muestras positivas para *Mycobacterium spp* (n= 14) y el 6.1% de la muestra total (n= 49)

Discusión: La frecuencia de amplificación de DNA de *M. tuberculosis* en nuestro trabajo es menor a la encontrada en previos. De nuestros positivos para *M. tuberculosis*, dos de ellos corresponden a formas clínicas no habitadas o tuberculídes (eritema indurado de Bazin y tuberculídes de la cara). Entonces, a pesar de que las manifestaciones cutáneas de la tuberculosis son raras, se continúan presentando casos en centros dermatológicos de referencia, como el nuestro.

Conclusiones: El uso de PCR múltiple en casos sugestivos clínicamente de tuberculosis cutánea y que cuentan con hallazgos histopatológicos compatibles, pero donde no es posible observar el microorganismo, es de gran utilidad.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica, causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En la piel puede presentar formas fijas (habitadas) y hematogénas (no habitadas), que dependen de la fuente de infección y estado inmunitario del huésped¹.

La tuberculosis (TB) representa un problema mayor de salud pública, es la novena causa mundial de muerte y la primera por enfermedades infecciosas. En el 2016 la cifra estimada por muertes de TB fue de 1,3 millones en personas VIH-negativas y 374 000 en personas VIH-positivas, la cifra estimada de personas que contrajeron TB ese mismo año fue de 10, 4 millones: 90% adultos y el 65% del sexo masculino, 10% eran personas infectadas por VIH (74% en África) y el 56% vivían en cinco países: Indonesia, China, India, Filipinas y Pakistán. El ritmo de disminución anual es de 3% para la tasa mundial de mortalidad y un 2% para la incidencia, pero 16% de los casos de TB mueren por esta causa. En América, en el 2016, el total de casos notificados fue de 233 793, con una tasa de incidencia de 27 casos por cada 100, 000 habitantes y la tasa de mortalidad fue de 1.7 por cada 100, 000 habitantes (excluyendo pacientes VIH positivos). Los casos predominan en hombres de más de 14 años, con un total de 173 000, en 2016.²

Cerca del 14% de los pacientes afectados por tuberculosis, presentan formas extrapulmonares y de estas, las lesiones cutáneas son manifestaciones relativamente poco frecuentes y ocurren solo en 1-2 % de los pacientes infectados. La tuberculosis cutánea es causada por el agente *Mycobacterium tuberculosis*, que pertenece a la clase *Schizomycetes*, orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*, genero *Mycobacterium* y ocasionalmente puede ser también causada por *M. bovis* o la vacuna de la BCG (cepas atenuadas de *M. bovis*)³. *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo aerobio estricto, intracelular facultativo, no móvil, tiene un período de crecimiento prolongado (16-20 horas) y son ácido alcohol resistentes, es decir, tiñen de rojo con fucsina y no se decoloran por la acción del ácido o alcohol.⁴

En cuanto a la patogénesis, los histiocitos o macrófagos tisulares constituyen una de las primeras líneas de defensa contra la micobacteria. Después de ser fagocitado, el bacilo queda dentro del fagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma y así los antígenos pueden ser procesados y presentado a los linfocitos T CD4+ a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Las células CD4+ de la respuesta Th1, desempeñan el papel más importante en la respuesta inmune hacia las micobacterias^{5,6}. Por otra parte, se ha demostrado que las vesículas apoptóticas originadas de células infectadas pueden estimular también la activación de linfocitos T CD8+, participando así también en la respuesta inmune de *M. Tuberculosis*⁷. Con respecto a la inmunidad innata, los neutrófilos son las primeras células inflamatorias en aparecer, seguidas de las células NK (natural killers) y macrófagos, el reconocimiento y fagocitosis de las bacterias son vía receptores de manosa, activación de complemento y receptores tipo Toll^{5,8}. Las citocinas son el componente central en la defensa contra las micobacterias, la secreción de IL-12 por los macrófagos después de reconocer la micobacteria, ocurre antes de la presentación de *M. tuberculosis* ante los linfocitos T. La IL12 induce la producción

de IFN-gamma en las células NK e induce la activación, diferenciación de las células de la respuesta Th1. Las células Th1 son la mayor fuente de IL-2 e IFN-gamma durante la respuesta inmune adquirida, que es necesaria para el control de la fase crónica de la infección. Es así como la IL-12 es la unión entre la respuesta inmune innata y la adquirida^{5,9}. El IFN-gamma es otro de los mediadores centrales en la respuesta inmune contra M. tuberculosis, este es capaz inducir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad, receptores de inmunoglobulinas, reclutamiento de linfocitos y en conjunto con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), activa a los macrófagos infectados. El TNF-alfa, es una citocina que también juega un papel central, contribuye a la formación de granulomas, que aíslan al bacilo y previenen su diseminación, este es liberado por los linfocitos T CD4+ y transforma a los macrófagos y monocitos en histiocitos especializados con capacidades bacteriostáticas y bactericidas⁴. Otras citocinas involucradas son: IL4, IL10, factor de crecimiento transformante-beta⁵

La clasificación de las formas clínicas de la tuberculosis cutánea es la siguiente:

1. Primoinfección: complejo cutáneo tuberculoso primario

2. Reinfeción

a) Formas fijas, habitadas, normoérgicas al PPD: tuberculosis verdadera

1. Colicuativa

- Escrofulodermia
- Seudomicetomas tuberculosos
- Gomas linfangíticos
- Gomas hematógenos

2. Luposa

- Lupus tuberculoso
- Tuberculosis luposa-verrugosa
- Tuberculosis causada por BCG

3. Verrugosa

- Tubérculo anatómico
- Tuberculosis verrugosa

4. Ulcerosa

5. Vegetante o ulcerovegetante

6. Miliar

b) Formas hematógenas, recidivantes, no habitadas e hiperérgicas al PPD: tuberculides

1. Nodular profunda

- Eritema indurado de Bazin
- Eritema indurado de Hutchinson

2. Nodulonecrótica

3. Micronodular

4. Tuberculide ulcerosa

5. Tuberculides de la cara

*1

Para el diagnóstico se pueden realizar:

Prueba de tuberculina (Mantoux): esta identifica a individuos previamente sensibilizados a *M. tuberculosis*, se hace positiva en 2 a 10 semanas posteriores a la infección. La prueba se lee 48 a 72 horas hrs después de la aplicación. El paciente se considera reactivo cuando la induración es mayor o igual a 5 mm para pacientes con inmunodeficiencia y mayor de 10 mm para pacientes inmunocompetentes¹⁰. Para la tuberculosis cutánea presenta una sensibilidad entre 33-96% y especificidad de 62.5% con un cohorte de 10 mm y cada presentación clínica por separado presenta una positividad variable¹¹.

Ensayos de liberación de interferón gamma: evalúan la infección latente al medir el interferón gamma producido por las células T de individuos que fueron expuestos a *M. tuberculosis*. Actualmente el QuantiFERON-TB Gold y el T-SPOT.TB son los disponibles y aprobados por la FDA. Para TB pulmonar presentan una sensibilidad de 76% y 90% respectivamente. Con respecto a la especificidad, el QFT-G presenta 99% en pacientes no vacunados y 96% en pacientes vacunados comparado con 93% para ambos grupos con el T-SPOT.TB¹². Para casos de TB cutánea, el T-SPOT.TB presenta una sensibilidad de 91.6% y especificidad de 75.8%, por los falsos positivos debido a infecciones cutáneas por micobacterias atípicas¹³.

Búsqueda de bacilos en frotis: se realiza con tinción de Ziehl-Neelsen y es útil en lesiones exudativas, por la alta carga bacteriana (ej. Escrofulodermia)¹⁰

Cultivo: se considera el estándar de oro para diagnóstico. Presenta una sensibilidad de 80-85% y especificidad de 98.5% en formas pulmonares. En presentaciones cutáneas, la positividad aún es más baja, cerca del 23%, el cual incrementa a 75% con el uso de medios de cultivo radiométricos^{10,14}.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR): usado como complemento en la evaluación clinicopatológica. Amplifica el ADN de *M. tuberculosis* presente en tejidos frescos, sangre o bloques de parafina, confirmando así, la presencia de la micobacteria. Este puede ser convencional, en tiempo real, con hibridación o *in situ*¹⁰.

Estudios genéticos: se utilizan diferentes técnicas moleculares para tipificar *M. tuberculosis*, ayuda a la secuenciación de genes de resistencia para evaluar mutaciones y correlacionar con resultados de epidemiología molecular con datos de epidemiología clásica. Es útil para separar micobacterias atípicas de *M. tuberculosis* y detectar mutaciones que inducen resistencia a antibióticos¹⁰.

Histopatología

Todas las variedades clínicas de tuberculosis cutánea presentan características histopatológicas similares, las diferencias entre ellas resulta de la variación en la respuesta inmunológica del huésped y su capacidad de formar granulomas. El hallazgo histopatológico más común es el granuloma tuberculoide, observado en 42.8 a 72.2% de las muestras¹⁵, pero las características que son consideradas sugestivas o típicas de la enfermedad no siempre son encontradas. Es por eso que se ha dividido la histología de la tuberculosis cutánea en tres grupos:

1. Granulomas tuberculoideos bien formados sin necrosis caseosa
2. Granulomas tuberculoideos con necrosis caseosa
3. Granulomas poco formados con intensa necrosis caseosa

Granulomas tuberculoideos bien formados con ausencia de necrosis caseosa

- Lupus vulgar: epidermis atrófica o hipertrófica, acantosis, papilomatosis o hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Granulomas tuberculoideos bien formados, células gigantes multinucleadas (CGM) tipo Langhans o granulomas tipo cuerpo extraño. Puede haber granulomas sarcoidales, infiltrado inflamatorio por linfocitos intenso y necrosis caseosa poco frecuente. La observación de bacilos es infrecuente.

Granulomas tuberculoideos con necrosis caseosa

- Tuberculosis verrugosa: hiperqueratosis, acantosis, papilomatosis, granulomas tuberculoideos con necrosis caseosa, se pueden encontrar bacilos.
- Tuberculosis cutánea primaria: en lesiones tempranas hay un infiltrado neutrófilico necrosante con muchos bacilos y en lesiones tardías hay formación de granulomas con disminución en el número de bacilos
- Tuberculosis aguda miliar: infiltrado inflamatorio no específico por linfocitos, células plasmáticas, necrosis caseosa. El número de bacilos es variable
- Tuberculosis periorificial: granulomas tuberculoideos con necrosis caseosa, ulcera superficial.
- Tubercúlides papulonecróticas: necrosis en dermis con infiltrado granulomatoso, vasculitis leucocitoclástica y necrosis folicular

Granulomas poco formados con necrosis caseosa intensa

- Escrofuloderma: necrosis masiva, remanentes de granulomas a la periferia
- Tuberculosis gomosa: ulceración central, necrosis caseosa rodeada por CGM e histiocitos. Los bacilos se detectan frecuentemente¹⁰.

El diagnóstico de TB cutánea es un reto, debido a su naturaleza paucibacilar y distribución poco uniforme de la bacteria. El diagnóstico de TB cutánea se sugiere por la clínica y compatibilidad con hallazgos histopatológicos, pero el criterio

absoluto es el aislamiento del microorganismo mediante cultivo, frotis o biología molecular.

El estudio histopatológico es esencial, pero en la mayoría de los casos el bacilo no puede ser observado, con un rango bajo entre 0-5%, sumado a que las características histológicas que son consideradas sugestivas o típicas de la enfermedad no son siempre encontradas¹⁰. Es por eso que técnicas como la PCR han emergido como herramientas prometedoras, con resultados rápidos, pero con sensibilidad variable y costo elevado

El objetivo de este estudio fue identificar *Mycobacterium tuberculosis* mediante reacción en cadena de polimerasa en especímenes de piel fijados en parafina que mostraron una dermatitis granulomatosa y difusa sugestiva de tuberculosis cutánea

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, prolectivo y transversal. Se buscó en la base electrónica de datos del servicio de dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, especímenes de piel que mostraron una dermatitis granulomatosa y difusa sugestiva de tuberculosis cutánea, en un período de enero de 2010 a diciembre del 2018. El criterio de inclusión fue que contuvieran material suficiente para realizar la PCR. Se recolectaron datos de sexo, edad, diagnóstico clínico de envío y evolución. Posteriormente se realizó PCR múltiple al DNA extraído de los bloques de parafina seleccionados, que contienen los iniciadores para la amplificación de: gen 16S rRNA 5'GAGATACTCGAGTGGCGAAC 3', 5'CAACGCGACAAACCACCTAC 3' para *Mycobacterium spp*, gen rv0577 5'ATGCCCAAGAGAAGCGAATACA 3', 5'AATGTCAGCCGGTTCCGCAA 3' para *Mycobacterium tuberculosis complex* y gen RD9 5'GTGTAGGTCAGCCCATCC 3', 5'GTAAGCGCGTGGTGTGGA 3' para *Mycobacterium tuberculosis*²⁰. Se utilizó un control positivo de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* (IMSS Queretaro) y como control negativo de reacción, agua. Posteriormente, de los especímenes positivos para *M. tuberculosis* específicamente, se realizó revisión de la histopatología en H&E y tinción especial de Ziehl-Neelsen, para describir el patrón histológico presentado, así como la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 67 casos sugestivos de tuberculosis cutánea por correlación clínico-histopatológica, de los cuales se excluyeron 18 por no cumplir con los criterios diagnósticos compatibles con una tuberculosis cutánea. De los 49 especímenes de piel fijados en bloques de parafina incluidos, 14 fueron positivos para *Mycobacterium spp* mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), 7 fueron del sexo masculino (50%) y 7 del sexo femenino (50%), la edad varió en un rango desde los 2-78 años. La morfología de las lesiones, tiempo de evolución y diagnóstico clínico de envío se especifican en la tabla 1. De los 14 casos mencionados, 4 fueron positivos para *M. tuberculosis complex* (Fig 1 y 2).

De los especímenes de piel que resultaron positivos para *Mycobacterium tuberculosis complex* (n= 4) mediante PCR, 3 fueron positivos para *Mycobacterium tuberculosis* específicamente (se encuentran sombreados en la tabla 1). Lo cual representa el 4.6% de las muestras positivas para *Mycobacterium spp* (n= 14) y el 6.1% de la muestra total (n= 49). Dos pacientes fueron del sexo femenino y la edad promedio fue de 38.3 años

En correlación clínico-patológica, las formas clínicas encontradas fueron: Tuberculosis cutánea ulcerosa, eritema indurado de Bazin y tuberculídes de la cara. En cuanto al patrón histopatológico encontrado fueron: 1 paniculitis lobulillar sin vasculitis, 1 paniculitis lobulillar con reacción vascular inflamatoria por linfocitos y neutrófilos y 1 con granulomas tuberculoides con necrosis caseosa. Las 3 muestras fueron negativas para bacilos ácido-alcohol resistentes mediante la tinción especial Ziehl-Neelsen, en el estudio histopatológico. Un paciente tuvo antecedente de baciloscopia negativa y no se contó con datos de cultivo (tabla 2).

DISCUSIÓN

La tuberculosis cutánea es una de las formas clínicas poco frecuentes de la tuberculosis, representando apenas el 1-2% de todos los casos¹⁴. En nuestro país, un estudio reveló que 3% de 114 pacientes con diversas dermatosis, fueron diagnosticados como tuberculosis cutánea, 20% de estos fueron niños menores de 15 años y con una incidencia mas alta en el sexo femenino²¹.

El diagnóstico de la tuberculosis puede representar un reto, debido a su naturaleza paucibacilar y distribución no uniforme de la bacteria²². Se han empleado diversos métodos para su diagnóstico, como: baciloscopia, cultivo, histopatología, prueba de tuberculina, ensayos de interferón gamma (IGRAs) y Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

La PCR demostró ser la técnica diagnóstica más útil para las formas multibacilares de la tuberculosis cutánea, con una sensibilidad reportada del 50-72% en el trabajo de Hsiao (17). En nuestro trabajo se aisló en 3 casos *Mycobacterium tuberculosis*, de 49 especímenes de piel estudiados, lo cual representa el 6.1%, cifras mucho menores en comparación con el estudio de Mehta, donde se detectó *M. tuberculosis* mediante PCR anidada, en 24 casos de 30 bloques de parafina estudiados²².

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo en el 2017 por Agarwal y cols. se incluyeron 70 pacientes con sospecha clínica de tuberculosis cutánea, de los cuales se confirmó el diagnóstico en 49 casos, ya sea por PCR, cultivo o histopatología¹⁶. La histopatología compatible con tuberculosis cutánea fue positiva en los 45 casos, el cultivo fue positivo solo en 8 y la amplificación de *M. tuberculosis* mediante PCR fue positiva en 12 casos. Esta última representando el 24.4% de la muestra total, frecuencia que también es más alta en comparación con nuestro estudio. No se encontraron bacilos ácido-alcohol resistentes en ninguno de los casos, lo cual es similar a nuestro trabajo.

Cabe mencionar que de nuestros casos en donde se amplificó *M. tuberculosis*, dos de ellos corresponden a formas clínicas no habitadas o tuberculídes (eritema indurado de Bazin y tuberculídes de la cara). Sin embargo, se ha demostrado en

estudios previos el aislamiento de DNA de *M. Tuberculosis* mediante PCR en pacientes con diagnóstico de eritema indurado de Bazin y tuberculides de la cara²¹.
23

La limitante del trabajo presentado, es que por haber obtenido el material de los bloques de parafina tal vez no contuvieron la carga bacteriana suficiente de DNA para ser detectada mediante PCR.

En conclusión, la tuberculosis continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. A pesar de que las manifestaciones cutáneas de la tuberculosis son raras, se continúan presentando casos en centros dermatológicos de referencia, como el nuestro. Un hallazgo importante de nuestro trabajo fue el éxito de aislar *M. tuberculosis* de formas clínicas que se han descrito como no habitadas, situación que abre un campo de investigación ante los conceptos de formas clínicas habitadas y no habitadas. Por lo tanto, el uso de PCR múltiple en casos sugestivos clínicamente de tuberculosis cutánea y que cuentan con hallazgos histopatológicos compatibles, pero donde no es posible observar el microorganismo, es de gran utilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arenas R. Dermatología, atlas, diagnóstico y tratamiento. 5ta edición. México: McGraw Hill; 2013
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017. Francia:World Health Organization; 2017. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/MainText_13Nov2017.pdf?ua=1
3. Belo J, Figueiredo A, Ferraz C, de Oliveira M, Gomes da Silva P, Silveira V. Cutaneous tuberculosis: epidemiologic, etiopathogenic and clinical aspects - Part I. *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):219-28.
4. Reis M, Bernardes F, Quaresma M, Valério L, da Cosra J, Ruben D. Update on cutaneous tuberculosis. *An Bras Dermatol*. 2014;89(6):925-38.
5. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Bras Pneumol*. 2007;33:323-34.
6. North RJ, Jung YJ. Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:599-623.
7. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*. 2006;24:105-17.
8. Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol*. 2004;16:35-41.
9. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005;85:53-64.
10. Belo J, Figueiredo A, Ferraz C, de Oliveira M, Gomes da Silva P, Silveira V. Cutaneous tuberculosis: diagnosis, histopathology and treatment - Part II *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):219-28.
11. Ramam M, Malhotra A, Tejasvi T, Manchanda Y, Sharma S, Mittal R, et al. How useful is the Mantoux test in the diagnosis of doubtful cases of cutaneous tuberculosis? *Int J Dermatol*. 2011;50:1379-82.
12. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008;149:177-184
13. Lai CC, Tan CK, Lin SH, Liu WL, Liao CH, Huang YT, et al. Diagnostic value of an enzyme-linked immunospot assay for interferon- γ in cutaneous tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:60-4.

14. Aggarwal P, Singal A, Bhattacharya SN, Mishra K. Comparison of the radiometric BACTEC 460 TB culture system and Löwenstein-Jensen medium for the isolation of mycobacteria in cutaneous tuberculosis and their drug susceptibility pattern. *Int J Dermatol*. 2008;47:681-7.
15. Thakur BK, Verma S, Hazarika D. A clinicopathological study of cutaneous tuberculosis at Dibrugarh district, Assam. *Indian J Dermatol*. 2012;57:63-5.
16. Agarwal P, Singh E, Agarwal U, Meena R, Purohit S, Kumar S. The role of DNA polymerase chain reaction, culture and histopathology in the diagnosis of cutaneous tuberculosis. *Int J Dermatol*. 2017;56(11):1119-1124
17. Hsiao P, Tzen C, Chen H, Su H. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Int J Dermatol*. 2003;42(4):281-6.
18. Tan S, Tan H, Sun Y, Goh C. Clinical utility of polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in different types of cutaneous tuberculosis and tuberculids. *Ann Acad Med Singapore*. 2001;30(1):3-10.
19. Almaguer-Chávez J, Ocampo-Candiani J, Rendón A. Current panorama in the diagnosis of cutaneous tuberculosis. *Actas Dermosifiliogr*. 2009;100:562-70.
20. Chae H, Han S, Kim S, Ki C, Huh H, Yong D, Koh W, Shin S. Development of One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection of Major *Mycobacterium* Species. *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2736-275
21. Maldonado C, Ramos A et al. Nested Polymerase Chain Reaction and Cutaneous Tuberculosis. *Am J Dermatopathol*. 2019; 41(6): 428-435
22. Mehta PK, Raj A, Singh N, et al. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 66: 20–36.
23. Magalhaes T, Dammert V, et al. Erythema induratum of Bazin: Epidemiological, clinical and laboratorial profile of 54 patients. *J Dermatol*. 2018 May;45(5):628-629.

Anexos.

Tabla 1. Datos clínicos de pacientes con *Mycobacterium spp.* mediante Reacción en Cadena de Polimerasa

PACIENTE	SEXO	EDAD	TOPOGRAFÍA	MORFOLOGÍA	DURACIÓN	DIAGNÓSTICO CLÍNICO
1.	F	50	Cuello	Nódulos eritematosos	6 meses	Micobacteriosis
2.	F	78	Miembros inferiores y oreja derecha	Nódulos	10 años	Tb cutánea
3.	M	54	Muslo izquierdo	Úlcera	1 mes	Tb cutánea
4.	M	48	Retroauricular bilateral	Neoformación ulcerada	1 año	Linfoma cutáneo
5.	M	23	Occipital	Nódulos eritematosos	1 mes	Tb cutánea
6.	F	27	Miembros inferiores	Nódulos	7 años	Eritema nudoso
7.	M	41	Oreja izquierda	Nódulos	6 meses	Leishmaniasis cutánea
8.	F	34	Mejillas y frente	Pápulas eritematosas	3 meses	Sarcoidosis
9.	M	6	Tórax anterior derecho	Neoformación eritematosa	2 meses	Dermatofibroma protuberans
10	F	45	Nariz, mejillas, párpados	Placas eritematosas	1 año	Lupus Eritematoso Sistémico
11.	M	2	Submandibular izquierdo	Úlcera	1 año	Actinomicosis
12	M	50	Párpado superior izquierdo	Edema y eritema	1 mes	Amiloidosis
13	F	48	Espalda	Manchas hiperpigmentadas	2 años	Enfermedad de tejido conectivo
14	F		Miembros inferiores	Nódulos		Tb cutánea

Tabla 2. Resultados generales de pacientes con tuberculosis cutánea confirmados mediante Reacción en Cadena de Polimerasa

PACIENTE	CORRELACIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA	HISTOPATOLOGÍA	TINCIÓN ZIEHL NEELSEN EN BIOPSIA DE PIEL	BACILOSCOPIA	CULTIVO	PCR
1	Tuberculosis cutánea ulcerosa	Paniculitis lobulillar sin vasculitis	Negativo	Negativa	No especificado	Positivo
2	Eritema indurado de Bazin	Paniculitis lobulillar con reacción vascular inflamatoria por linfocitos y neutófilos	Negativo	No especificado	No especificado	Positivo
3	Tuberculides de la cara	Dermatitis granulomatosa con granulomas tuberculoideos con necrosis	Negativo	No especificado	No especificado	Positivo

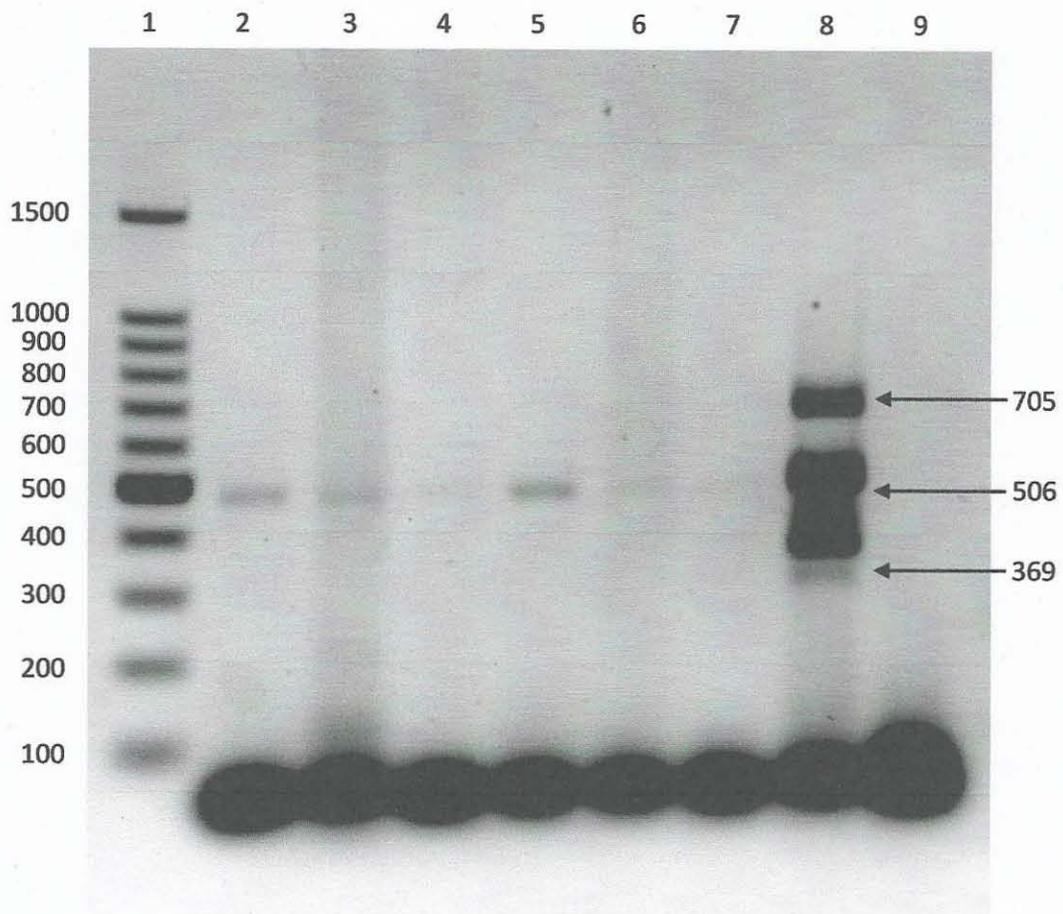


Fig. 1. Amplificación de *M. tuberculosis* complex, *Mycobacterium* spp. y *M. tuberculosis* (PCR-Múltiple). Carril 1: Marcador de peso molecular: 100 pb DNA ladder; Carril 2: Muestra 01 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 3: Muestra 02 positiva a *M. tuberculosis* complex; Carril 4: Muestra 03 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 5: Muestra 05 positiva a *M. tuberculosis*; Carril 6: Muestra 06 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 7: Muestra 07 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 8: Muestra 12 Control positivo *M. tuberculosis*; Carril 9: Control negativo.

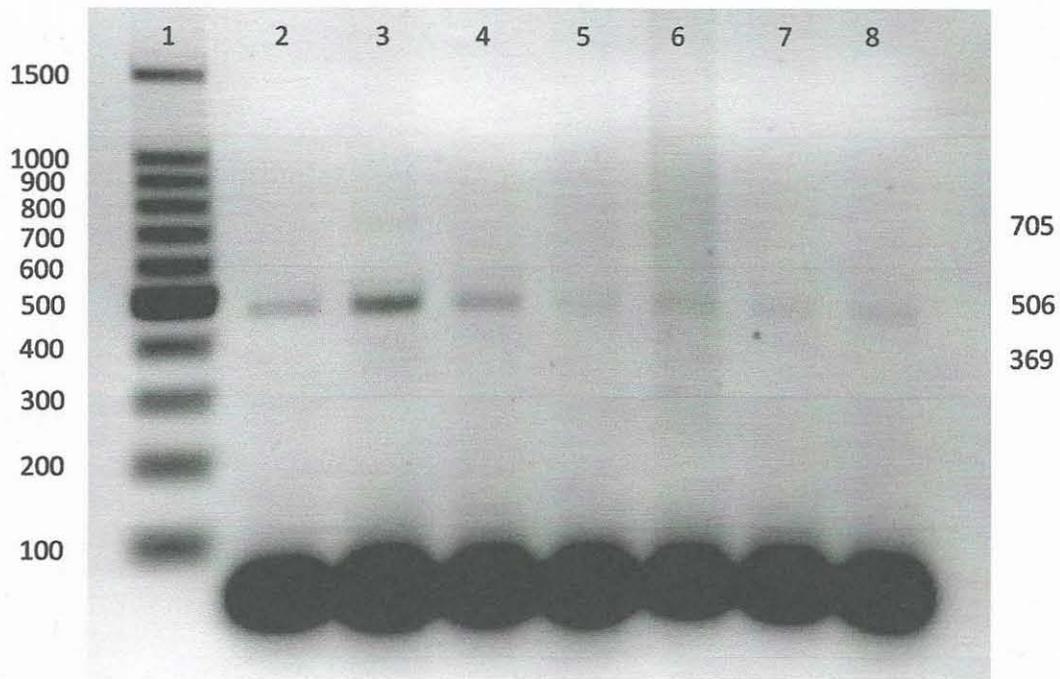


Fig 2. Amplificación de *M. tuberculosis* complex, *Mycobacterium* spp. y *M. tuberculosis* (PCR-Múltiple). Carril 1: Marcador de peso molecular: 100 pb DNA ladder; Carril 2: Muestra 14 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 3: Muestra 17 positiva a *M. tuberculosis*; Carril 4: Muestra 21 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 5: Muestra 35 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 6: Muestra 40 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 7: Muestra 46 positiva a *Mycobacterium* spp.; Carril 8: Muestra 47 positiva a *Mycobacterium* spp.