

RESUMEN

Introducción. La Tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades con mayor mortalidad en el mundo. La OMS estima que se diagnostican más de 8 millones de casos nuevos por año y aproximadamente 3 millones de personas mueren de esta enfermedad. Se hace muy necesario contar con un método diagnóstico que permita detectar todos los casos.

Objetivo. Validar la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) frente a la Baciloscopía para el diagnóstico de Tuberculosis.

Materiales y Método. Con un diseño de validación de prueba se recopilaron 100 muestras de esputo de igual número de pacientes. Se realizó baciloscopía y la prueba de RCP y se midió sensibilidad, especificidad, likelihood ratio + y likelihood ratio – como análisis inherentes a la prueba en sí.

Resultados. La población de estudio tuvo más mujeres (n = 55%), de ellas el 21% estuvo entre 40 y 59 años. El 65% de la muestra provino de la zona urbano.

La sensibilidad de la prueba de RCP fue del 100% (IC95% 50 – 100), la especificidad del 72,73% (IC95% 63,4 – 82,01) y



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

el Likelihood Ratio (+) del 3.6 (IC95% 2,6 – 5,01). No se pudo calcular el Likelihood Ratio (–) por el valor de la sensibilidad.

Discusión. La Reacción en Cadena de la Polimerasa parece tener más capacidad diagnóstica que la baciloscopia para diagnosticar la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar.

La inversión en diagnóstico permitirá ahorrar en tratamiento, es más fácil romper la cadena en un eslabón débil como la prevención y no en un eslabón difícil como el tratamiento.

Palabras Claves: Descriptores DeCS: Tuberculosis, Cadena de la Polimerasa (PCR), baciloscopia, validación, sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo I

Introducción

Planteamiento del Problema

Justificación

Capítulo II

Fundamento Teórico

Tuberculosis

2.1. Generalidades

2.2. Epidemiología

2.2.1 Situación Mundial

2.2.2 Situación Nacional

2.3 Diagnóstico de Tuberculosis

2.3.1 Diagnóstico Microbiológico

2.3.2 Diagnóstico Biomolecular

2.4 Definición Etiopatogenia y Aspectos Clínicos

2.4.1 Agente Causal

2.4.2 Paciente Infectado

2.4.3 Paciente Enfermo

2.4.4 Historia Natural de la Enfermedad

2.4.5 Patogenia e Inmunidad



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

2.4.6 Manifestaciones Clínicas

Capítulo III

Hipótesis

Objetivos

Capítulo IV

Diseño Metodológico

4.1 Tipo de Estudio

4.2 Área de Estudio

4.3 Universo y Muestra

4.4 Variables

4.5 Matriz de Operacionalización de las Variables

4.6 Métodos, Técnicas e Instrumentos

4.7 Análisis De La Información

4.8 Interpretación de los Resultados

4.9 Aspectos Éticos

Capítulo V

Resultados

Capítulo VI

Discusión

Capítulo VII

Conclusiones y Recomendaciones



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA**

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Capítulo VIII

Anexos

Capítulo IX

Bibliografía



Universidad de Cuenca

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.



Universidad de Cuenca

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Detectar Mycobacterium Tuberculosis en pacientes sintomáticos respiratorios mediante PCR.

Tesis previa a la obtención del Título de: Médico

**AUTORES: Pedro Andrés Llerena Gómez
Daniel Paúl Manosalvas Durán
Andrés Esteban Ordoñez Ugalde**

**DIRECTOR: DR. SERGIO GUEVARA
ASESOR: DR. PABLO CORDERO**

**Cuenca – Ecuador
JULIO 2009**

**AUTORES: Pedro Andrés Llerena Gómez
Daniel Paúl Manosalvas Durán
Andrés Esteban Ordoñez Ugalde**

ABSTRACT

Overview. Tuberculosis remains one of diseases with increased mortality in the world. WHO estimates that they are diagnosed over 8 million new cases per year and approximately 3 million people die of this disease. It is very necessary to have a differential method to detect all cases.

Objective. Validate the reaction in chain the polymerase (CPR) vs. the Bacilloscopically for the diagnosis of TB test.

Materials and methods. 100 equal number of patients sputum samples were collected with a validation test design.

He was bacilloscopically and proof of CPR and measured sensitivity, specificity, likelihood ratio (+) and likelihood ratio (-) as inherent to the test itself analysis.

Results. The study population had more women (n = 55 %), these 21 per cent was between 40 and 59 years. 65 % Of the sample came from the area urban. The sensitivity of PCR test was 100 % (IC95 % 50-100), the specificity of the 72,73 % (IC95 63,4-82,01 %) and the Likelihood Ratio (+) 3.6 (IC95% 2.6-5,01). Not you could calculate the Likelihood ratio (-) by the value of sensitivity.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Discussion. Polymerase chain reaction seems to have more diagnostic capacity than the bacilloscopically to diagnose pulmonary and extrapulmonary TB.

Investment in diagnosis will save in treatment, is easier to break the chain in a weak as prevention link and not in a hard link as the treatment.

Key words: Tuberculosis, chain of the polymerase (PCR), baciloscopia, validation, sensitivity, specificity, likelihood ratio.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

RESPONSABILIDAD

Las limitaciones de los métodos tradicionales de laboratorio para la detección e identificación de micobacterias han creado la necesidad de implementar nuevas estrategias para: disminuir el tiempo necesario para el análisis de las muestras remitidas al laboratorio clínico y aumentar la capacidad de detección de casos. Un avance en este campo es el sistema de detección mediante Reacción en cadena de Polimerasa. Las pruebas rápidas y directas que detectan ácidos nucleicos resultan atractivas para el diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis. Nosotros los autores del presente trabajo nos responsabilizamos completamente por los datos obtenidos y por las consecuencias de su publicación.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TB) es la infección de mayor prevalencia en el mundo. Sin embargo hay que diferenciar entre dos conceptos diferentes: infección y enfermedad tuberculosa.

La infección Tuberculosa se produce cuando el sujeto entra en contacto con *Mycobacterium tuberculosis*, en las personas inmunocompetentes, la reacción inmune es suficiente para controlar la infección inicial en algunos, pero no todos se eliminan los bacilos y en otros entran en un estado de quiescencia intracelular.

La enfermedad tuberculosa viene definida por la presencia de síntomas y/o hallazgos en la exploración física del paciente sugestivos de enfermedad activa, y que serán variables en función de la localización de la enfermedad.

En el año 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la tuberculosis constituía “Una emergencia global”.

Emergencia global debida al aumento de casos y a una progresión alarmante de los casos ocasionados por cepas con resistencia múltiple a los antituberculosos. Este aumento fue debido al gran incremento ocurrido en algunas regiones del Continente africano y del Este europeo, y otros países en vías de desarrollo, contrastado con lo que sucede en países desarrollados, en los que la tuberculosis ha permanecido estable o mayoritariamente ha disminuido.¹

La Tuberculosis aun en esta época es una enfermedad con alta mortalidad. Cada año se diagnostican más de 8 millones de casos nuevos, el 95% de estos en países en vías de desarrollo², es por esto que La Tuberculosis es considerada una enfermedad socio-económica con implicaciones médicas.

En Ecuador la incidencia de TB fue de 29,45 por cien mil habitantes en el 2003, diagnosticándose un promedio de 4000 casos por año, de los cuales el 85% son TB de formas

¹ Pérez, Emilio. *Tuberculosis en Euskadi. XVIII Jornadas de Pediatría de Álava. Vitoria, 10 de noviembre de 2006.*

² Bresky R Gustavo, Silva Z Nelly, Madariaga G Juan. *Esofagitis tuberculosa en un paciente HIV positivo. Rev. méd. Chile [serial on the Internet]. 2007 Oct [cited 2009 July 05]; 135(10): 1323-1326.*

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

pulmonares y 62% de ellos diagnosticados por medio de Baciloscopia (BK).³

Los casos BK+ de TB pulmonar, por ser la principal fuente de transmisión de esta enfermedad, actualmente se ha priorizado su búsqueda y atención precoz. En nuestro país el 79% de las tuberculosis pulmonares registradas en el año 2001 fueron pulmonares BK+ (4439 casos) con una tasa de incidencia del 34.47 por 100.000 habitantes, cuyo mayor impacto epidemiológico se da en el grupo económicamente productivo, es decir afecta a los grupos de 15 a 29 años y de 30 a 49 años en un 44.58% y 27.80% respectivamente.⁴

Se estima que una persona con tuberculosis activa no tratada, infecta una media de 10 a 15 personas al año⁵. Este dato nos hace pensar seriamente que se requieren métodos diagnósticos efectivos para controlar oportunamente esta patología, pues el puntal fundamental de la erradicación de la

³ Manual de normas técnicas, métodos y procedimientos para el control de la tuberculosis. 1ra. ed. Quito. MSP. 2002. Págs.: 1-3, 15-17.

⁴ Jorge Martín Llaca Díaz, Amador Flores Aréchiga, María Gloria Martínez Guerra y Pedro César Cantú Martínez. Rev. Salud pública y nutrición. 2003. Vol 4 No.3 Julio-Septiembre.

⁵ OMS, Global Tuberculosis Control, 2007. www.who.int/mediacentre/factsheet/fs104/es/index.html



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Tuberculosis es evitar diseminación de la misma controlando la aparición de nuevos casos.

En nuestro país el principal método diagnóstico y el que es usado como método de referencia en los programas de Control de Tuberculosis del Ministerio de Salud Pública es la Baciloscopia seriada. Esta prueba tiene una Sensibilidad del 30-40% Y una Especificidad del 97%⁶, provocando una gran cantidad de falsos negativos.

La Baciloscopia consiste en buscar mediante microscopia óptica simple, bacilos que sean resistentes a la decoloración con alcohol-acido luego de ser teñidas con el método de Ziehl-Neelsen. En las placas se observaran bastoncillos delgados de color rojo y con gránulos en su interior, aislados, en pares o agrupados sobre un fondo azul claro. El resultado reportara la cantidad de bacilos observados por campo⁷.

⁶ D'Alessandro Adriana, de Waard Jacobus H. Evaluación de dos pruebas comerciales para el serodiagnóstico de la tuberculosis pulmonar. Rev. chil. infectol. 2008 Feb [citado 2009 Jul 05]; 25(1): 37-40.

⁷ Ramón Fúnez Solórzano*, Cecilia Varela-Martínez+, Métodos Diagnósticos en Tuberculosis: lo convencional y lo nuevo. Rev. Med. Hondur. 2006, 74:93-101.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) es otro método que ha demostrado una eficacia diagnóstica elevada para Tuberculosis pulmonar, sin embargo no existe consenso sobre en qué situaciones realizarlas; estudios recientes muestran que una indicación sería en pacientes con sospecha clínica moderada-alta frente a una Baciloscopia negativa, especialmente útil en pacientes no bacilíferos. Este método se basa en la amplificación exponencial de una secuencia específica de ADN única del Bacilo a partir de una muestra mínima, que luego pueda ser detectada mediante electroforesis en gel de agarosa. La sensibilidad para este método es del 97% y una especificidad del 17%.

Las ventajas que aporta la RCP respecto a los métodos microbiológicos en el diagnóstico de tuberculosis son una mayor sensibilidad respecto a la Baciloscopia y la rapidez respecto al cultivo⁸. La RCP reporta grandes ventajas a la hora de detectar pacientes y por tanto permite iniciar oportunamente el tratamiento, ya que al poseer una mayor sensibilidad permite

⁸ Rafael Laniado-Laborí, Martha Livier Enríque, Alexei Fedórovich Licea Navarroll, Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2001, Vol 14, 1:22-26

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

identificar a aquellos pacientes que de otro modo con la Baciloscopia hubieran resultado negativos.

Por todo lo anteriormente citado planteamos que la Baciloscopia es una prueba que genera falsos negativos que la RCP si sería capaz de detectarlos; el objetivo de este trabajo es responder la pregunta que si la RCP es más efectiva que la Baciloscopia al detectar Mycobacterium Tuberculosis en pacientes sintomáticos respiratorios, comparando su eficacia con la finalidad de contribuir en el mejoramiento del diagnóstico de Tuberculosis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Tuberculosis (TB) sigue siendo una de las enfermedades con mayor mortalidad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se diagnostican más de 8 millones de casos nuevos de TB, y aproximadamente 3 millones de personas mueren de esta enfermedad ⁵.

El 95% de los casos a nivel mundial ocurren en países en vías de desarrollo como el nuestro, donde hay mucha pobreza y escasos recursos para estudios diagnósticos y tratamiento, y hay una elevada prevalencia de infección por el virus del VIH ⁷.

La TB siempre ha ocurrido en forma desproporcionada entre poblaciones en desventaja como son las personas sin hogar, desnutridos o en hacinamiento⁷. En las últimas décadas se ha vuelto claro que la diseminación de la infección por Virus de la Inmuno deficiencia Humana (VIH) y la migración de las poblaciones ha incrementado el número de casos a nivel mundial.

En Ecuador, esta enfermedad ha estado presente desde tiempos remotos, los primeros diagnósticos se establecieron en la conquista y en la colonia, precisamente en base a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, de tal manera que existen datos bibliográficos de ilustres ciudadanos afectados por la enfermedad en ese tiempo.

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Desde el punto de vista de salud pública y de control de la enfermedad, se ha dado una real importancia a la búsqueda precoz y atención de los casos nuevos de TB Pulmonar y dentro de estos se prioriza a la TB Pulmonar BK+, por constituir la principal fuente de transmisión de la Tuberculosis. Esto se refleja claramente, pues en Ecuador la tasa de incidencia de TB en el 2000 fue de 60,84 por cien mil habitantes, y en el Azuay del 62,53, diagnosticándose 5500 en todo el año; de los cuales 2192 fueron BK (+), que para el 2007 la tasa de incidencia nacional descendió a 28,87 y en el Azuay a 8,40, con el total de 480 casos nuevos⁹. En el 2008 la incidencia nacional fue del 32,04% y la del Azuay del 16,62%¹⁰; cuyo mayor impacto epidemiológico se da en el grupo económicamente productivo, es decir afecta a los grupos de 15 a 29 años y de 30 a 49 años en un 44.58% y 27.80% respectivamente¹¹.

⁹ MSP, Número de casos y tasas de incidencia anual de tuberculosis pulmonar bk+ y bk- según Provincias y regiones - ecuador 2000 – 2007. Disponible en: <http://www.msp.gov.ec/images/tuberculosis%20pulmonar.pdf>

¹⁰ MSP, Programa del Control de la Tuberculosis, Estadísticas actuales, 2008. Disponible en: http://www.msp.gov.ec/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=50&Itemid=143

¹¹ Romero N, Martín M. C Intervención en tuberculosis pulmonar en una comunidad andina en Ecuador a través de la estrategia TAES/DOTS centrada en la comunidad. Cerdanyola del Vallès: GRAAL, Unitat de Bioestadística, Universitat Autònoma de Barcelona; 2007. Informe nº: GR-UAB-07-2.

Durante muchos años se ha estado utilizando solo pruebas de tipo microbiológico, la Baciloscopia y el Cultivo, que tienen limitaciones; la mayor limitación de la Baciloscopia es la baja sensibilidad de tal manera que para mejorar su sensibilidad deben efectuarse al menos tres Baciloscopias seriadas, hecho que también limita su uso por el abandono del paciente en entregar las siguientes muestras, otro de los problemas para el manejo individual es que la enfermedad debe haber avanzado sustancialmente, para que permita que la persona tengan concentraciones suficientes de bacilos para que la tinción sea positiva (arriba de 10mil bacilos por cm³ de esputo). En este sentido el cultivo es más sensible por cuanto requiere concentraciones mucho menores (10-100 bacilos por cm³ de esputo) con la limitante que el cultivo por medios sólidos requiere de varias semanas (6-8) para brindar resultados.⁷

En los últimos 15 años se han realizado investigaciones tratando de mejorar la sensibilidad, especificidad, rapidez y costos de los medios diagnósticos de Tuberculosis. Una prueba que ha mostrado particular interés es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), es una técnica “in vitro” que imita la

habilidad natural de duplicar el ADN; para esta prueba el laboratorista toma una muestra mínima de material genético, replica la secuencia de interés las veces necesarias y generar suficiente cantidad de muestra para detectar la presencia o ausencia de patógenos y en muchos casos realizar la cuantificación del mismo¹².

Las ventajas que aportan los métodos de Ampliación Genética respecto a los métodos clásicos en el diagnóstico de tuberculosis son la sensibilidad respecto al examen microscópico y la rapidez respecto al cultivo en tuberculosis pulmonar.

Investigar más aun sobre estos nuevos métodos y poder aplicarlos en nuestro medio sería una forma más de apoyar la lucha contra la Tuberculosis.

¹² Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, and Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine bacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2049-2056.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

JUSTIFICACIÓN

La detección de *Mycobacterium Tuberculosis* por RCP resultaría en nuestro medio un apoyo para el diagnóstico de Tuberculosis, ya que en la actualidad se cuenta solamente con la Baciloscopia como técnica de detección rápida.

Se escogieron los principales Centros de Salud de la ciudad para este estudio, en donde las muestras se investigaron por Baciloscopia, mediante la cual se llega a un 60% a 80% de pacientes positivos y existe un margen que no es diagnosticado y por tanto no reciben el tratamiento farmacológico adecuado ni a tiempo, resultando así un foco de infección para su familia y el resto de la población, pudiendo ser esta una de las razones y posible respuesta al aumento de los casos de TB en los últimos años.

Al realizar el diagnóstico con RCP conseguiríamos disminuir el porcentaje de pacientes no diagnosticados y por consiguiente ayudar al control de esta enfermedad.

A partir del año 1993 se generó una gran preocupación por la nueva epidemia de Tuberculosis en que la OMS tomó una decisión sin precedentes y declaró emergencia mundial para la misma. Según datos ofrecidos por la OMS se estima que entre el 2000 y 2020, cerca de un billón de personas se reinfectará nuevamente, 200 millones contraerán la enfermedad y 35 millones morirán, si antes no se promueven medidas de control efectivas.

A pesar de que la RCP es una prueba más cara, si tomamos en cuenta que permite el diagnóstico y tratamiento precoz de la TB, este gasto se transforma en inversión, pues disminuimos el número de posibles contagios a partir de los casos que de otro modo no se hubieran diagnosticado, evitando también las repercusiones socio-económicas que conlleva.



CAPITULO II

FUNDAMENTO TEÓRICO

TUBERCULOSIS

2.1 GENERALIDADES

La Tuberculosis (TB) es la infección de mayor prevalencia en el mundo. Sin embargo hemos de diferenciar entre dos conceptos diferentes: infección y enfermedad tuberculosa.
13,14,15

La infección Tuberculosa se produce cuando el sujeto entra en contacto con *Mycobacterium tuberculosis*, desencadenándose en su organismo una respuesta inmune. En la mayoría de los casos esta respuesta consigue detener la multiplicación de los bacilos y se controla la infección inicial, pero no destruye la totalidad de los mismos y algunos

¹³ Laniado, R. Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 14 (1): 22 – 26. 2001.

¹⁴ Revista chilena de enfermedades respiratorias On-line ISSN 0717-7348 Rev. chil. enferm. respir. vol.22 no.3 Santiago Sept. 2006

¹⁵ Nolte FS, Metchok B, McGowan JE Jr, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1993;31: 1777-1782

persisten en estado de latencia intracelularmente⁸. El estado de infección TB se diagnostica por la prueba de la tuberculina¹⁵. Estas personas no presentan síntomas ni hallazgos en la exploración física sugestivos de enfermedad, pero están infectadas y un 10% de ellas se enfrentan a un riesgo, durante toda su vida, de desarrollar la enfermedad.¹⁶

No podemos conocer qué personas desarrollarán la enfermedad, pero si se conocen los factores de riesgo que las hacen más propensas a enfermar, como la existencia de un contagio reciente, de infección por el VIH, de enfermedades crónicas debilitantes (diabetes, IRC, desnutrición), de tratamientos inmunosupresores o envejecimiento, que pueden debilitar el sistema inmune. La susceptibilidad para desarrollar enfermedad también está incrementada en los 5 primeros años de vida, pubertad, adolescencia y en la edad avanzada.¹⁷

La enfermedad tuberculosa viene definida por la presencia de síntomas y/o hallazgos en la exploración física del paciente

¹⁶ Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Levy-Frebault VV. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2476-2478.

¹⁷ Kirihaara JM, Hillier SL, Coyle MB. Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J Clin Microbiol* 1985;22:841-845.

sugestivos de enfermedad activa, y que serán variables en función de la localización de la enfermedad. Las localizaciones más frecuentes son: pulmonar, pleural, ganglionar, miliar, meníngea, osteo-articular, gastrointestinal, genitourinaria y otras.

En un 5% de los pacientes que se infectan con *Mycobacterium tuberculosis* su sistema inmunitario será insuficiente para impedir el desarrollo de la enfermedad cuando se contagian y se producirá la denominada TB primaria. En otro 5 % de los infectados, tras el paso de meses o años, se producirá la enfermedad por reactivación endógena, TB posprimaria.¹⁸

Una persona con tuberculosis activa no tratada infecta una media de 10 a 15 personas al año¹⁹. Sin embargo, no todos los sujetos infectados por el bacilo de la tuberculosis necesariamente desarrollan la enfermedad. El sistema inmunológico “empareda” los gérmenes que, aislados por una

¹⁸ MJ García País, MT Rigueiro Veloso, E Casariego Vales, JC Corredoira Sánchez, J Valera Otero, JF García Rrodriguez, *Tuberculosis, Guías Clínicas*, 2003; 3(25). Rrodriguez, *Tuberculosis, Guías Clínicas*, 2003; 3(25).

¹⁹ OMS, *Global Tuberculosis Control*, 2007. www.who.int/mediacentre/factsheet/fs104/es/index.html

gruesa envoltura cérica pueden permanecer en estado latente durante años. El riesgo de enfermar aumenta cuando el sistema inmunológico de la persona está debilitado.¹

Cada segundo se produce en el mundo una nueva infección por el bacilo de la tuberculosis. Una tercera parte de la población mundial está actualmente infectada por el bacilo de la tuberculosis.

Del 5% al 10% de las personas infectadas por el bacilo de la tuberculosis (y que no están infectadas por el VIH), enferman o son contagiosas en algún momento de sus vidas. Las personas con coinfección por el VIH y la tuberculosis tienen muchas más probabilidades de enfermar por tuberculosis.^{7,20}

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1 SITUACIÓN MUNDIAL

Se calcula que en 2007 hubo 9,27 millones de casos incidentes de TB en todo el mundo, es decir más que los 9,24, 8,3 y 6,6 millones registrados en 2006, 2000 y 1990,

²⁰ Bloom, Barry R. Tuberculosis -- The Global View. N Engl J Med 2002 346: 1434-1435

respectivamente. En 2007 la mayoría de esos casos se registraron en Asia (55%) y África (31%); en las regiones del Mediterráneo Oriental, Europa y Américas las cifras correspondientes fueron del 6%, 5% y 3%, respectivamente. Los cinco países con mayor número de casos en 2007 fueron la India (2,0 millones), China (1,3 millones), Indonesia (0,53 millones), Nigeria (0,46 millones) y Sudáfrica (0,46 millones). De los 9,27 millones de casos incidentes registrados en 2007, se calcula que 1,37 millones (15%) eran VIH-positivos, de los cuales el 79% correspondió a la Región de África, y el 11% a la Región de Asia Sudoriental. (Fig.1)^{21, 22}

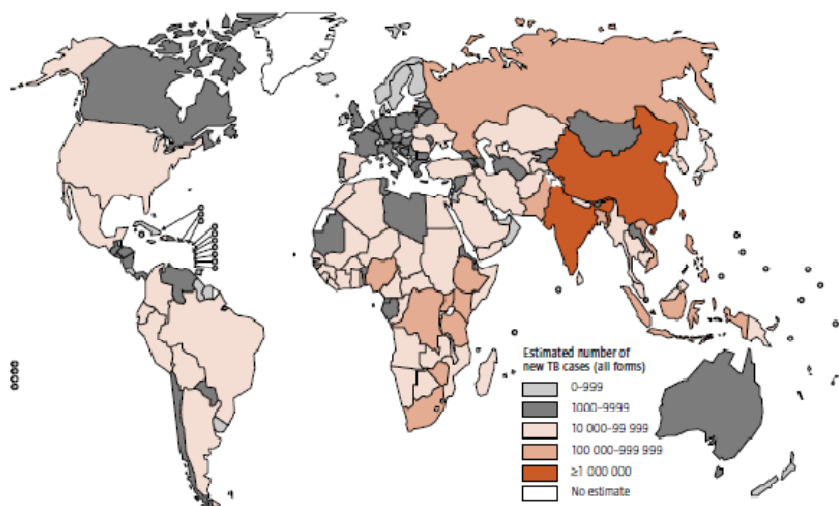
Figura 1. Número estimado de nuevos casos de TB, por país. 2007.

²¹ GARCIA, Luis Fernando and JARAMILLO, Ernesto. La tuberculosis: un reto que debemos enfrentar. *Biomédica*, June 2004, vol.24 suppl.1, p.5-8. ISSN 0120-4157

²² WHO, Comunicado de prensa conjunto de la OMS, la Alianza Alto a la Tuberculosis y el Banco Mundial, 2 DE DICIEMBRE DE 2007 | WASHINGTON, D.C

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Estimated number of new TB cases, by country, 2007



Fuente: WHO, Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009.

WHO/HTM/TB/2009.411

Aunque el número absoluto de casos incidentes de TB está aumentando debido al crecimiento de la población, la tasa de incidencia está disminuyendo, aunque a ritmo lento (menos del 1% al año). La tasa mundial de incidencia alcanzó su valor máximo (142 casos por 100 000 habitantes) en 2004; en 2007, la estimación fue de 139 casos por 100 000. La tasa de incidencia está disminuyendo en cinco de las seis regiones de la OMS; la excepción es la Región de Europa, donde se mantiene más o menos estable. Los casos prevalentes de TB

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

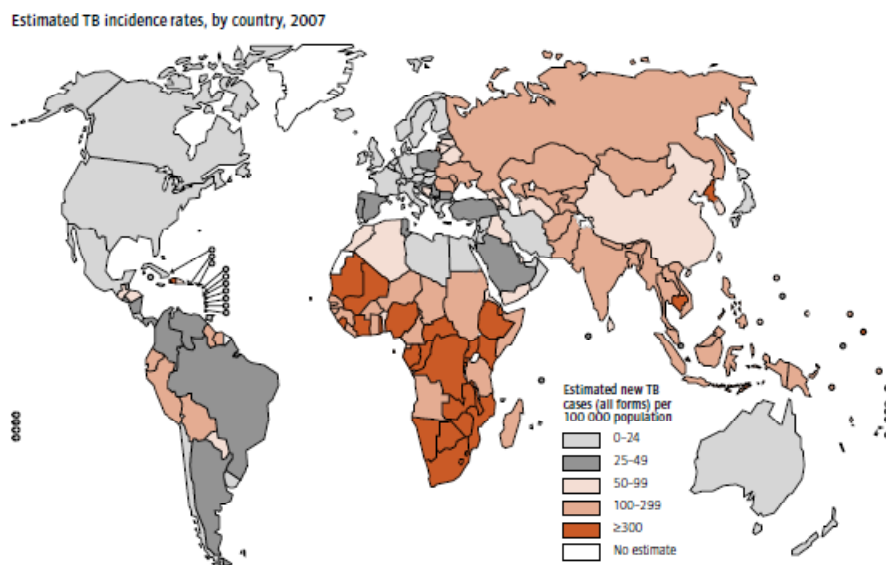
en 2007 fueron 13,7 millones (206 por 100 000), es decir, menos que los 13,9 millones (210 por 100 000) estimados en 2006. (Fig. 2)

Se calcula que en 2007 hubo 1,3 millones de muertes entre los casos incidentes de TB VIH-negativos (20 por 100 000), y 456 000 entre los VIH-positivos. Estas últimas son consideradas como muertes por VIH en la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10), y representan un 33% de los casos incidentes de TB VIH-positivos y un 23% de los 2 millones de muertes por VIH que se calcula que hubo en 2007.²³

²³ HIV-TB Spreads In Africa, Undermines Control Of World's Two Deadliest Infectious Diseases, *Rev. ScienceNews*. Nov. 4, 2007, 44:032.

Figura 2. Índice de incidencia estimado de TB por país.

2007



Fuente: WHO, Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009.

WHO/HTM/TB/2009.411

Las tasas de prevalencia y mortalidad están disminuyendo en todo el mundo y en cada una de las seis regiones de la OMS. Las regiones de las Américas, Mediterráneo Oriental y Asia Sudoriental están en el buen camino para alcanzar las metas de la Alianza “Alto a la Tuberculosis” consistentes en reducir a la mitad las tasas de prevalencia y mortalidad en 2015, en comparación con las de 1990. La Región del Pacífico

Occidental también está en el buen camino para reducir la prevalencia a la mitad, aunque es posible que no alcance por poco la meta referida a la mortalidad. En las regiones de África y Europa no se alcanzará ninguna de las dos. Las grandes diferencias existentes en estas dos regiones entre las tasas de prevalencia y mortalidad registradas en 2007 y las metas fijadas hacen que sea poco probable que en 2015 se logre reducir en todo el mundo ambas tasas a la mitad de sus valores de 1990.

En 2007 las cifras estimadas de casos de TB y de muertes por TB en pacientes VIH-positivos se han duplicado en comparación con las publicadas por la OMS en años anteriores, pero eso no significa que el número real de dichos casos y muertes se haya duplicado entre 2006 y 2007. Lo que ocurre es que se han utilizado nuevos datos disponibles en 2008, especialmente de pruebas solicitadas por los proveedores de atención en la Región de África¹⁰.

Se calcula que en 2007 hubo 0,5 millones de casos de TB multidrogo resistente (TB-MDR), el 85% de los cuales



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

corresponden a 27 países (15 de ellos de la Región de Europa). Los cinco países con mayor número de casos de TB-MDR son la India (131 000), China (112 000), la Federación de Rusia (43 000), Sudáfrica (16 000) y Bangladesh (15 000). A finales de 2008, 55 países y territorios habían notificado al menos un caso de TB ultrarresistente.

El Grupo de Trabajo Mundial de la OMS sobre Medición del Impacto de la TB ha hecho recomendaciones sobre cómo medir los progresos efectuados con respecto a la reducción de las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad de la TB (los tres indicadores principales del impacto). Entre dichas recomendaciones se encuentran el análisis sistemático de los datos de notificación nacionales y regionales, combinado con la mejora de los sistemas de vigilancia para medir la incidencia, las encuestas sobre la prevalencia de la TB que se realizarán entre 2008 y 2015 en 21 países de atención preferente, y el reforzamiento de los sistemas de registro civil para medir la mortalidad por TB entre otras causas de muerte. La aplicación de las recomendaciones del Grupo de Trabajo es necesaria para mejorar la medición de los progresos hacia la consecución

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

de la metas fijadas para 2015, así como para medir los progresos que se realicen en materia de control de la TB en años posteriores.^{24,25}

2.2.2 SITUACIÓN NACIONAL

En el nuestro la situación epidemiológica de la tuberculosis no es muy distinta a la situación mundial. Según datos del Reporte Global de Tuberculosis 2009 en Ecuador la incidencia durante el 2007 fue 101 casos por 100000 habitantes HIV (-), y de 9.2 casos en la población HIV (+), con una reducción del 2.9% y 0.7% respectivamente, en relación al 2006; la mortalidad global se halla en 23 casos por 100000 habitantes acercándose bastante a la meta de 20 muertes por 100000 habitantes fijada para el 2015. Se encontró que el 9.2% de los casos nuevos son multidrogo resistentes (MDR). La cobertura que se alcanzo mediante el DOTS fue del 96% de la

²⁴ WHO, *Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009.* WHO/HTM/TB/2009.411

²⁵ Organización Panamericana de la Salud. El control de la tuberculosis en las Américas. Boletín Epidemiológico. OPS. 1998; 19(2):1-8.

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

población, abertura alcanzada gracias al funcionamiento de 161 unidades operativas a nivel nacional.^{8,11,26,27}

2.3 DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

2.3.1 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El descubrimiento del agente causal por el Dr. Robert Koch en Alemania en 1882, permitió avanzar en el diagnóstico microbiológico. La Prueba de Ziehl Neelsen o tinción ácido alcohol resistente fue descrita por dos doctores alemanes: Franz Ziehl (1859-1929) microbiólogo y Friedrich Neelsen (1854-1894), patólogo. La tinción utiliza carbolfucsina, ácido alcohol y azul de metileno. Las micobacterias se tiñen de rojo, lo cual permite establecer la presunción diagnóstica²⁸.

²⁶ MSP, Número de casos y tasas de incidencia anual de tuberculosis pulmonar bk+ y bk- según Provincias y regiones - Ecuador 2000 – 2007. Disponible en: <http://www.msp.gov.ec/images/tuberculosis%20pulmonar.pdf>

²⁷ MSP, Programa del Control de la Tuberculosis, Estadísticas actuales, 2008. Disponible en: http://www.msp.gov.ec/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=50&Itemid=143

²⁸ Ramón Fúnez Solórzano*, Cecilia Varela-Martínez+, Métodos Diagnósticos en Tuberculosis: lo convencional y lo nuevo. Rev. Med. Hondur. 2006, 74:93-101

En países con alta prevalencia la enfermedad es confirmada con la clínica y la Baciloscopia, siendo estrategia fundamental, encontrar al sintomático respiratorio (paciente con más de 15 días de tos con expectoración)²⁹ a través de la búsqueda pasiva.

La ventaja del método de la Baciloscopia es que puede ser efectuada en casi cualquier lugar y que el hallazgo de bacilos ácido alcohol resistente en áreas con alta prevalencia es prácticamente confirmatorio el diagnóstico de la enfermedad. Múltiples estudios han demostrado el incremento de la sensibilidad, manteniendo la especificidad, si se efectúan Baciloscopias seriadas, o se concentra y sedimenta la muestra de esputo, así como con el uso de microscopio fluorescente.

La falla en establecer correctamente el diagnóstico de tuberculosis expone al paciente a un régimen medicamentoso equivocado y retrasar el tratamiento apropiado.

²⁹ *Manual de normas técnicas, métodos y procedimientos para el control de la tuberculosis. 1ra. ed. Quito. MSP. 2002. Págs.: 1-3, 15-17.*

Sin embargo es bien conocido el hecho de que existen limitaciones de sensibilidad y especificidad de la prueba de Ziehl Neelsen, de tal manera que para mejorar su valor predictivo positivo deben efectuarse al menos tres Baciloscopias seriadas, (la segunda Baciloscopia capta de un 7 a un 13% más de pacientes, la tercera, alrededor de 4% más de pacientes con tuberculosis) lográndose con esto hasta un 85% de detección del paciente tuberculoso bacilífero en localidades de moderada o alta prevalencia¹⁴. Uno de los problemas para el manejo individual es que la enfermedad debe haber avanzado sustancialmente, para que permita que las personas tengan concentraciones suficientes de bacilos para que la tinción sea positiva (arriba de 10mil bacilos por cm³ de esputo). En este sentido el cultivo es más sensible por cuanto requiere concentraciones mucho menores (10-100 bacilos por cm³ de esputo) con la limitante que el cultivo por medios sólidos requiere de varias semanas (6-8) para brindar el resultado. Sin embargo existen pacientes con tuberculosis activa cuyas Baciloscopias seriadas son negativas. La radiografía de tórax, altamente sensible, es sin embargo

inespecífica y el diagnóstico de tuberculosis no debe ser establecido solo por este método.⁶

Los estudios revelan los dos extremos cuando se hace diagnóstico en base a los hallazgos radiológicos, por un lado exceso de diagnóstico de la enfermedad (falsos positivos) y también exceso de falsos negativos. Por otro lado la tuberculosis puede afectar cualquier otro órgano del cuerpo.³⁰

La técnica de tinción utilizada es la de Ziehl-Neelsen tradicional. Cuando se examina al microscopio muestras de esputo u otras lesiones en donde estas bacterias se encuentran, su característica principal es su ácido-alcohol resistencia (BAAR) ya que son difíciles de teñir con fucsina pero una vez teñidos resisten a la decoloración con alcohol-ácido.

La técnica de tinción de Ziehl-Neelsen consiste en primero se fija la Baciloscopia con calor, se colocan los frotis sobre

³⁰ Miranda G Gonzalo, Díaz P Juan Carlos, Arancibia H Patricia, Antolini T Monica, Díaz G Carolina, Vidal F Alvaro. MANIFESTACIONES RADIOGRAFICAS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR. Rev. chil. radiol. [revista en la Internet]. 2004 [citado 2009 Jul 05]; 10(4): 178-182.

varillas y separados por un centímetro, se cubren con fucsina previamente filtrada. Se calientan los frotis flameándolas con una varilla provista en un extremo con torunda embebida en alcohol, hasta que empiece la emisión de vapores se deja de calentar y repite la operación dos veces más. Se elimina el colorante con agua corriente y chorro suave. Se agrega alcohol-ácido por 2 minutos. Se enjuaga con agua corriente y se aplica el colorante de contraste que es el azul de metileno por espacio de 5 minutos. Se enjuaga con agua corriente y se deja escurrir en forma vertical sobre papel absorbente hasta que se seque.³¹ La observación microscópica la debe realizar un experto en observación de Baciloscopias. Se emplea un microscopio binocular con oculares de 20X y objetivo de inmersión 100X.

La observación debe establecer en primer término si se encuentran BAAR en el extendido y si los hay, el número aproximado de ellos por campo microscópico.

³¹ Wanger, A., R. Clark, J. Bua, A. Edwards, and J. Ho. 1996. Comparison of MB/BacT and conventional methods for detection of mycobacterium species, abstr. U-40, p. 107. In Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Cada campo microscópico debe observarse en superficie y profundidad. Los bacilos aparecen como bastoncillos delgados de color rojo y con gránulos en su interior, aislados, en pares o agrupados sobre un fondo azul claro de la tinción de contraste. La contabilidad debe seguir una pauta uniforme de observación leyendo de izquierda a derecha del extendido un mínimo de 100 campos útiles distribuidos en el total del extendido.

El criterio a seguir en la Baciloscopia depende según la cantidad de bacilos encontrados:

- Si no se encuentran bacilos debe examinarse por lo menos 100 campos útiles.
- Si se encuentran de 1 a 10 bacilos por campo es suficiente observar 50 campos.
- Si se encuentran más de 10 bacilos por campo es suficiente observar 20 campos.

Terminada la observación de la Baciloscopia es requisito que se limpie con algodón el objetivo de inmersión para evitar que se transporten fragmentos de una Baciloscopia a otra.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Informe de resultados.

Negativo: no se observan BAAR en 100 campos observados.

Positivo +: se observan menos de un bacilo por campo en promedio en 100 campos observados.

Positivo ++: se observan de 1 a 10 bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.

Positivo +++: Se observan más de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados.

Es necesario encontrar como mínimo 4 BAAR en la Baciloscopia para reportarlo positiva, si se encuentran de 1 a 3 bacilos esta es la conducta a seguir:

1. Ampliar la lectura a 200 campos.
2. Si lo anterior no modifica la lectura repetir la Baciloscopia.
3. Si se encuentra la misma cantidad de bacilos (1 a 3) se reporta como negativo poniendo una nota en el diario de trabajo sobre lo observado.³²

³² Jorge Martín Llaca Díaz, Amador Flores Aréchiga, María Gloria Martínez Guerra y Pedro César Cantú Martínez. *Rev. Salud pública y nutrición*. 2003. Vol 4 No.3 Julio-Septiembre.

2.3.2 DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es una técnica de la biología molecular que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN que puede ser detectada tras electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La técnica puede realizarse en tan solo 24 a 48 horas y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis y resultados negativos en la tinción de Ziehl-Neelsen o el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas y en pacientes con cuadros atípicos asociados con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o a la inmunosupresión por trasplante. La amplificación de secuencias específicas de ADN micobacteriano mediante RCP ha sido utilizada en cultivo y directamente en muestras biológicas. Sin embargo, se han reconocido dos grandes obstáculos al éxito de la técnica: las dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción del ADN, y la presencia de inhibidores de la RCP. La

manipulación necesaria en la mayoría de los protocolos de extracción del ADN descritos los hace propensos a la contaminación cruzada de las muestras; además, es necesario utilizar reactivos y procedimientos agresivos que eventualmente podrían conducir a la pérdida del genoma micobacteriano presente en la muestra. Otros factores que pueden afectar a la sensibilidad y especificidad de la técnica son la variabilidad biológica y la amplificación inespecífica.^{14,33}

En el campo del diagnóstico clínico, los laboratoristas pueden tomar una muestra mínima de material genético, copiar la secuencia de interés las veces necesarias y generar suficiente cantidad de muestra para detectar la presencia o ausencia de patógenos y en muchos casos realizar la cuantificación del mismo. Esta es una tecnología patentada que genera múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos de un organismo. La tecnología de RCP, ideada por Kary Mullis y desarrollada por un equipo de científicos de la Corporación Cetus, fue publicada por primera vez el año 1985

³³ Rafael Laniado-Laborí, Martha Livier Enríque, Alexei Fedórovish Licea Navarroll, Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2001, Vol 14, 1:22-26

en la revista científica Science y es reconocida como una de las herramientas más poderosas de la Biología Molecular. El Dr. Mullis, se hizo acreedor del Premio Nobel en Química 1993 por este aporte.

Hay disponibles múltiples sistemas basados en la amplificación de los ácidos nucleicos de las micobacterias. Existen múltiples objetivos para amplificar incluyendo fragmentos de DNA o RNA. El más frecuentemente estudiado y amplificado en tuberculosis es IS6110³⁴. De acuerdo a la FDA (Food and Drugs Administration), la sensibilidad de los test para tuberculosis, comparada con la de los cultivos es de aproximadamente 95% en pacientes con Baciloscopias positivas pero solo de alrededor de 50% en pacientes con Baciloscopias negativas.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), al multiplicar en millones de veces un fragmento determinado ADN permite la identificación de diferentes maneras:

³⁴ CAPCHA A, Luis, URBINA B, Martha, VASQUEZ C, Lucy et al. Perfiles genéticos (IS6110) y patrones de resistencia en aislamientos de M. tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. Lima Sur, Perú. Rev. Perú. med. exp. salud pública, Ene./mar. 2005, vol.22, no.1, p.4-11. ISSN 1726-4634.

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

- Amplificar con cebadores apropiados y detectar después un fragmento específico de una determinada especie por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.
- Amplificar un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias y después identificarla por medio de sondas genéticas específicas.
- Amplificar un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias, someterlas a lisis con enzima de restricción y visualizar los fragmentos de restricción en gel de agarosa. Esta metodología denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa y análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RCP-RFLP) es de gran utilidad en la identificación rápida de las especies de *Mycobacterium*.

Estos sistemas permiten un diagnóstico de tuberculosis en pocas horas. Las pruebas de biología molecular actualmente en uso en el laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis son AMTDT (Gee-Probe), basado en la amplificación enzimática del RNA ribosómico, AMPLICOLOR (*Mycobacterium*

tuberculosis RCP test, Roche Diagnostic Sytems) basado en la amplificación del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa y el LCx (LCR *Mycobacterium tuberculosis* assay, Abbott Laboratories), sistema de amplificación que utiliza la reacción de la ligasa.³⁵

Sin embargo su aplicabilidad está limitada por una baja sensibilidad (menor que el cultivo, pero mayor que la Baciloscopia) y alto costo. Datos de la literatura, confirman excelentes resultados en especímenes respiratorios con tinción positiva, en lo que se basa las recomendaciones de FDA. Estas técnicas tienen una especificidad de más del 95% y una sensibilidad mayor del 95% en pacientes con Baciloscopia positiva, sin embargo se señalan las limitaciones de estos métodos en muestras extrapulmonares y muestras con Baciloscopia negativas; sin embargo se reconoce que estas pruebas de amplificación genética (AG) pueden tener utilidad para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar con Baciloscopias

³⁵ Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT. RCP detection of *Mycobacterium tuberculosis*. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. pp. 191-196.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

negativas o tuberculosis extrapulmonar en grupos selectos de pacientes.

El diagnóstico de estas formas de la tuberculosis, aunque poco importante desde el punto de vista epidemiológico, constituye un reto para el clínico, debido a lo atípico de sus manifestaciones, en ocasiones a la escasa expresividad clínica y, en la mayoría de los casos, a las dificultades que plantea la confirmación microbiológica mediante los métodos clásicos. Existen muchos estudios publicados comparando los métodos de Ampliación nucleica (PAN) con el examen microscópico y el cultivo de material obtenido de enfermedad extrapulmonar, la mayoría con muestras seleccionadas y, por lo tanto, no totalmente extrapolables sus resultados a la práctica diaria.

A modo de resumen, las ventajas que aportan los métodos de Ampliación Genética respecto a los métodos clásicos en el diagnóstico de tuberculosis son la sensibilidad respecto al examen microscópico y la rapidez respecto al cultivo en

tuberculosis pulmonar.³⁶ En la tuberculosis extrapulmonar los métodos de PAN son más sensibles que el examen microscópico y que el cultivo. Además, la Ampliación Genética permite la confirmación rápida de que el BAAR (bacilos alcohol-ácido resistentes) detectado en el examen microscópico es *M tuberculosis*. Entre las limitaciones de estos métodos hay que destacar que puede no ser un método tan rápido como se propugna cuando se utiliza en laboratorios de microbiología que procesan pocas muestras, al final el análisis costo-eficiencia, teniendo en cuenta que, en la situación actual, es un método que complementa pero no desplaza a los anteriores, significa por lo tanto, un aumento de recursos humanos y materiales. Las indicaciones recomendadas por la Sociedad Torácica Americana para estos métodos incluyen principalmente la confirmación de que una Baciloscopia positiva es realmente *Mycobacterium tuberculosis*. Además con la disponibilidad de nuevas versiones de esta prueba con mayor sensibilidad, se puede utilizar para el diagnóstico rápido de pacientes con Baciloscopia negativa.

³⁶ Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.

El Centro para control de Enfermedades de los Estados Unidos recomienda la realización de RCP al mismo tiempo que el BAAR para detectar enfermedad por micobacterias no tuberculosas (BAAR positivo, RCP negativo).

También puede contribuir para diagnóstico rápido de casos difíciles (meningitis tuberculosa, tuberculosis diseminada en pacientes con SIDA), evitar técnicas cruentas (biopsia pleural, extirpación de adenopatías, biopsia hepática, biopsia ósea), evitar tratamientos empíricos ante cuadros donde los métodos tradicionales han sido poco rentables (tuberculosis renal, tuberculosis intestinal).

2.4 DEFINICIÓN ETIOPATOGENIA Y ASPECTOS CLÍNICOS

La tuberculosis, una de las enfermedades más antiguas que afectan al ser humano, es causada por bacterias pertenecientes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad suele asentar en los pulmones, pero en 33% de los casos afecta a otros órganos. Si se trata correctamente,

la tuberculosis debida a cepas sensibles a ciertos fármacos se cura prácticamente en todos los casos, pero sin tratamiento más de la mitad de los enfermos pueden morir en un plazo de cinco años. El contagio suele ocurrir por vía aérea, a través de las gotitas que expulsan los pacientes con tuberculosis pulmonar contagiosa.

2.4.1 AGENTE CAUSAL

Las micobacterias pertenecen a la familia Mycobacteriaceae y al orden Actinomycetales. De las especies patógenas que forman parte del complejo de *M. tuberculosis*, el agente más importante y frecuente de enfermedad en seres humanos es *M. tuberculosis*. El complejo incluye *M. bovis* (el bacilo de la tuberculosis bovina, que alguna vez fue causa importante de la enfermedad transmitida por leche no pasteurizada y que en la actualidad origina un pequeño porcentaje de casos en países en desarrollo); *M. africanus* (aislado de pacientes en las regiones occidental, central y oriental de África); *M. microti* (el "bacilo de los roedores", que es un microorganismo menos virulento y poco común) y *M.*

canettii (microorganismo aislado sólo en raras ocasiones, en pacientes africanos). *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria aerobia fina, no esporógena, cilíndrica, que mide 0.5 por 3µm. Las micobacterias, incluida la cepa mencionada, suelen no captar el colorante de Gram^{37,38} (son neutras). Sin embargo, una vez teñidos, los bacilos no pueden cambiar de color con el alcohol ni los ácidos, una propiedad que los caracteriza como bacilos. Esa resistencia a la coloración se debe principalmente a que estos microorganismos tienen en la pared celular gran cantidad de ácidos micólicos, de ácidos grasos de cadena larga y enlaces cruzados, y de otros lípidos. Hay otros microorganismos distintos de las micobacterias que son también alcohol- ácido resistentes, como las especies de *Nocardia* y *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*, y los protozoarios *Isospora* y *Cryptosporidium*.

En la pared celular de las micobacterias, los lípidos (p. ej., los ácidos micólicos) están unidos a los arabinogalactanos y a

³⁷ Sommers HM, McClatchy JK. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Morello JA, ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1983.

³⁸ Miller, N., Cleary, T., Kraus, G., Young, A. K., Spruill, G., Hnatyszyn, H. J. (2002). Rapid and Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Acid-Fast Bacillus Smear-Positive Respiratory Specimens and BacT/ALERT MP Culture Bottles by Using Fluorogenic Probes and Real-Time RCP. J. Clin. Microbiol. 40: 4143-4147

los peptidoglucanos subyacentes. Esta estructura es responsable de la escasísima permeabilidad de la pared celular y, por tanto, de la ineficacia que muestran contra este microorganismo la mayor parte de los antibióticos. Otra molécula que forma parte de la pared de las micobacterias, el lipoarabinomanan, interviene en la patogenia de la interacción agente patógeno-hospedador y favorece la supervivencia de *M. tuberculosis* en el interior de los macrófagos. Entre las distintas proteínas características de *M. tuberculosis* se encuentran las del derivado proteínico purificado (*purified protein derivative*, PPD) de la tuberculina, un precipitado de moléculas sin especificidad de especie que se obtiene por filtración de los extractos concentrados de los cultivos en caldo esterilizados por el calor. La secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* comprende alrededor de 4 000 genes y contiene gran cantidad de guanina-citosina. Una gran proporción de los genes se dedican a producir enzimas que intervienen en el metabolismo de la pared celular.³⁹

³⁹ Ridzon, Renee. Tuberculosis. N Engl J Med 2004 351: 2024

2.4.2 PACIENTE INFECTADO

M. tuberculosis se transmite casi siempre desde un paciente con tuberculosis pulmonar contagiosa a otras personas por medio de las gotitas respiratorias que la tos, el estornudo o la fonación convierten en un aerosol. Estas gotas diminutas se secan pronto; las menores (<10 µm de diámetro) pueden permanecer suspendidas en el aire durante horas y alcanzar las vías respiratorias terminales al ser inhaladas. Con cada golpe de tos se pueden expulsar nada menos que 3 000 gotitas contagiosas. Las demás vías de contagio del bacilo tuberculoso, como la piel o la placenta, son raras y no tienen significación epidemiológica.⁴⁰

Las probabilidades de entrar en contacto con un caso de tuberculosis, la duración e intimidad de ese contacto, el grado de contagiosidad y el ambiente que se comparte con la persona enferma son, todos ellos, factores importantes para la transmisión. En varios estudios sobre la intimidad de los contactos se ha demostrado claramente que los pacientes

⁴⁰ Jasmer, Robert M., Nahid, Payam, Hopewell, Philip C. Latent Tuberculosis Infection N Engl J Med 2002 347: 1860-1866

tuberculosos cuyos esputos contienen AFB visibles con el microscopio son los que más influyen en la propagación de la infección. Estos pacientes suelen padecer una tuberculosis pulmonar cavitaria, o una tuberculosis de las vías respiratorias (tuberculosis endobronquial o laríngea) y eliminan esputos que contienen nada menos que 10⁵ AFB/ml. Los pacientes tuberculosos con frotis del esputo negativo y cultivo positivo son menos contagiosos, y los enfermos con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar con cultivos negativos carecen prácticamente de contagiosidad.

La ausencia frecuente de cavidades en personas con infección por VIH puede aminorar su infecciosidad. Uno de los factores más importantes para la transmisión de los bacilos tuberculosos es el apiñamiento en espacios mal ventilados, porque intensifica el contacto con el enfermo.

En resumen, el riesgo de adquirir la infección tuberculosa depende principalmente de factores exógenos.

Debido al retraso en acudir al médico y en diagnosticar la enfermedad, se calcula que cada caso AFB positivo habrá contagiado a 20 personas antes de que haya podido ser diagnosticado en localidades con gran prevalencia de la enfermedad.

2.4.3. PACIENTE ENFERMO

A diferencia de lo que ocurre con el riesgo de adquirir la infección por *M. tuberculosis*, el riesgo de enfermar después de infectarse depende ante todo de factores endógenos, como la predisposición natural a la enfermedad y la eficacia funcional de la inmunidad celular. Las manifestaciones clínicas que aparecen inmediatamente después de la infección se denominan *tuberculosis primaria* y se observan con frecuencia en los niños de hasta cuatro años de edad. Esta forma puede ser grave y generalizada, pero no suele ser contagiosa. Cuando la infección se adquiere a edades más tardías hay mayor probabilidad de que el sistema inmunitario la contenga, por lo menos temporalmente. La mayoría de los individuos infectados que acaban enfermando de tuberculosis lo hace en

el primero o segundo año después de la infección. Sin embargo, pueden quedar bacilos en estado latente durante años antes de que se reactiven y produzcan la *tuberculosis secundaria* (o *posprimaria*), que suele ser contagiosa. En conjunto, se calcula que alrededor de 10% de las personas infectadas acabará padeciendo una tuberculosis activa. Sin embargo, el riesgo aumenta en grado considerable entre personas con infección por VIH. La reinfección de una persona anteriormente infectada, que probablemente es algo frecuente en las regiones con tasas altas de transmisión de la tuberculosis, puede contribuir también al desarrollo de la enfermedad. La tipificación molecular y la comparación de las cepas de *M. tuberculosis* sugieren que incluso 33% de los casos de tuberculosis activa del centro de las ciudades de Estados Unidos se debe a contagios recientes más que a la reactivación de infecciones latentes.²⁵

Otro factor importante que influye en el riesgo de enfermar después de la infección es la edad. Entre las personas infectadas, la incidencia de la tuberculosis es máxima al final de la adolescencia y comienzos de la edad adulta; las razones de

esto no se conocen bien. En las mujeres se observa una incidencia máxima entre los 25 y 34 años de edad. En este grupo de edad, la incidencia es mayor en las mujeres que en los varones, pero a edades más avanzadas, ocurre lo contrario. El riesgo de enfermar puede ser mayor en los ancianos debido posiblemente al deterioro de la inmunidad y a la coexistencia de otras enfermedades.⁴¹

Hay varias enfermedades y condiciones que favorecen el desarrollo de una tuberculosis activa. El factor de riesgo más importante es sin duda la infección simultánea por el VIH, que suprime la inmunidad celular. El riesgo de que una infección latente por *M. tuberculosis* se convierta en un proceso activo depende directamente del grado de inmunodepresión del paciente. En un estudio de personas PPD-positivas infectadas por el VIH ese riesgo osciló entre 2.6 y 13.3 casos por 100 personas y año, dependiendo del número de células CD4+.

⁴¹ F. L. Lado, v. Tuñez bastida, a. L. Golpe Gómez*, a. Cabarcos Ortiz de barrón, m. L. Pérez del molino. Tuberculosis en pacientes ancianos. Formas de presentación. 2002. AN. MED. INTERNA (Madrid) Vol. 19, N. ° 3, pp. 111-114

2.4.4 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Los estudios que se realizaron en varios países antes de la introducción de la quimioterapia demostraron claramente que la tuberculosis no tratada suele ser letal. Alrededor de 33% de los pacientes fallecía en el primer año tras el diagnóstico, y la mitad en los cinco años posteriores al mismo. Los pacientes con frotis del esputo positivo tuvieron una mortalidad a los cinco años de 65%.

Alrededor de 60% de quienes sobrevivían a los cinco años consiguió una remisión espontánea, pero los demás seguían expulsando bacilos tuberculosos.⁴²

Si los pacientes se someten a quimioterapia eficaz, oportuna y adecuada, tienen gran posibilidad de curar. Sin embargo, el uso inapropiado de antifímicos, a pesar de que disminuye la cifra de mortalidad, también origina un gran número de casos infecciosos crónicos, a menudo con bacilos fármaco resistentes.

⁴² Menzies, Dick *Tuberculosis: Current concepts and treatment N Engl J Med* 2000 343: 1819

2.4.5 PATOGENIA E INMUNIDAD

La interacción de *M. tuberculosis* con el hospedador humano comienza cuando las gotitas infecciosas de los pacientes contagiosos son inhaladas por alguna persona. La mayor parte de los bacilos quedan atrapados en las vías respiratorias superiores y son expulsados por el barrido ciliar de las células de la mucosa, pero una parte de ellos, por lo general menos de 10%, llegan hasta los alvéolos. Allí son englobados inespecíficamente por los macrófagos alveolares. Esta invasión de los macrófagos por las micobacterias puede deberse en parte a la unión del C2a a la pared celular bacteriana, seguida de la opsonización de las bacterias por el C3b y de su reconocimiento por los macrófagos. El equilibrio entre la actividad bactericida del macrófago y la virulencia del bacilo, ligada parcialmente a la riqueza en lípidos de la pared celular y a su cápsula glucolipídica, es el que determina los fenómenos que siguen a la fagocitosis.

Se conocen varios genes que, según se supone, confieren virulencia a *M. tuberculosis*. El gen *katG* codifica la catalasa⁴³, una enzima protectora frente a las agresiones oxidativas; el *rpoV* es el principal factor sigma que inicia la transcripción de varios genes. Los defectos de estos dos genes provocan la pérdida de la virulencia. También contribuye a la virulencia el gen *erp*, que codifica una proteína necesaria para la multiplicación del microorganismo. Los brotes de tuberculosis surgidos entre 1994 y 1996 en Tennessee y Kentucky son ejemplo de la forma en que la infección por cepas virulentas incrementa la transmisión, y con ello los índices de enfermedad. Se han detectado cepas de la familia del genotipo Beijing/W en brotes surgidos en diversos sitios y circunstancias en el mundo, y se han acompañado de cifras altas de mortalidad y de resistencia a fármacos.

Hay varias observaciones que indican que los factores genéticos desempeñan un papel esencial en la resistencia natural (sin intervención de la inmunidad) a la infección por *M. tuberculosis*. Así lo sugiere el distinto grado de sensibilidad a la

⁴³ Espinosa, A. Identificación rápida de mutaciones puntuales en el gen KatG en la identificación de *M. tuberculosis*. Rev Neumología Perú. 2004. Vol 48, 2:131-138.

tuberculosis que muestran las distintas poblaciones. En los ratones, un gen llamado *Nramp1* (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) tiene un papel regulador de la resistencia/ sensibilidad a las micobacterias. NRAMP1, homólogo humano clonado del cromosoma 2q, puede ser un elemento determinante en la predisposición a tuberculosis, según se deduce de estudios realizados de África occidental.

En la primera fase de interacción entre el hospedador y la bacteria puede ocurrir que los macrófagos con bacilos englobados inhiban su multiplicación gracias a la producción de enzimas proteolíticas y citocinas, o que los bacilos comiencen a multiplicarse. Si se produce esto último, su proliferación acaba por matar y lisis a los macrófagos. Los monocitos no activados que llegan a la lesión vehiculados por la sangre y atraídos por varios factores quimiotácticos fagocitan a los bacilos que fueron liberados por los macrófagos lisados. Estas primeras etapas de la infección suelen ser asintomáticas.

Unas dos a cuatro semanas después de la infección se producen dos nuevas respuestas del hospedador frente a *M.*

tuberculosis: una que es lesiva para los tejidos y otra que induce la activación de los macrófagos. La *respuesta de lesión hística* se debe a la reacción de hipersensibilidad retardada (*delayed-type hypersensitivity*, DTH) a diversos antígenos bacilares y destruye los macrófagos no activados que albergan a los bacilos en fase de multiplicación. La *reacción de activación de los macrófagos* es un fenómeno mediado por células que activa los macrófagos y les confiere la capacidad de destruir y digerir a los bacilos tuberculosos. Estas dos clases de respuesta pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias, pero el equilibrio entre ambas determinará la forma de tuberculosis que ulteriormente se desarrollará.

Cuando se adquiere la inmunidad específica y se acumulan muchos macrófagos activados en el sitio de la lesión primaria aparecen las lesiones granulomatosas (tubérculos). Estas lesiones están formadas por linfocitos y macrófagos activados, como las células epitelioides y las células gigantes. Al principio, la respuesta denominada lesión hística que acaba de producirse es el único cambio capaz de contrarrestar la proliferación de las micobacterias dentro de los macrófagos.

Esta respuesta, que está mediada por varios productos bacterianos, no sólo destruye a los macrófagos, sino que también causa una necrosis sólida precoz en el centro del tubérculo. Los bacilos pueden seguir vivos, pero su proliferación queda inhibida en este ambiente necrótico debido a la escasa tensión de oxígeno y al pH bajo. En este momento, algunas lesiones pueden curar por fibrosis y calcificación, mientras que otras siguen evolucionando.

La inmunidad celular en esta primera fase es esencial. En la mayoría de las personas infectadas los macrófagos locales se activan cuando los antígenos bacilares procesados por los macrófagos estimulan los linfocitos T para que liberen diversas linfocinas. Estas células activadas se acumulan rodeando la lesión y neutralizan eficazmente los bacilos tuberculosos sin provocar nuevas destrucciones hísticas. En el centro de la lesión, existe material necrótico que se asemeja al queso blando (*necrosis caseosa*), fenómeno también observado en otras enfermedades, como las neoplasias. Aunque se produzca la curación hay bacilos viables que permanecen en estado latente dentro de los macrófagos o del material necrótico

durante años o incluso durante toda la vida del paciente. Estas lesiones "curadas" del parénquima pulmonar y de los ganglios hiliares pueden calcificarse más adelante.

En una minoría de casos, la respuesta de activación de los macrófagos es débil y la proliferación micobacteriana sólo puede ser inhibida si se intensifica la reacción de DTH, que provoca destrucción hística. En ese caso, la lesión tiende a aumentar de tamaño y a extenderse cada vez más al tejido circundante. En el centro de la lesión, el material caseoso se licua. Se produce entonces la invasión y destrucción de las paredes bronquiales y de los vasos sanguíneos, seguido de la formación de cavidades. El material caseoso licuado, abundante en bacilos, se expulsa a través de los bronquios. Dentro de las cavernas, los bacilos se multiplican y propagan por las vías respiratorias y se expulsan con la expectoración. En las primeras fases de la infección muchos macrófagos transportan a los bacilos hasta los ganglios linfáticos regionales, desde donde se difunden ampliamente a muchos órganos y tejidos. Las lesiones resultantes pueden evolucionar de la misma forma que las pulmonares, aunque gran parte

tiene tendencia a curar. En los niños pequeños, con escasa inmunidad natural, la diseminación hematógena puede acabar en una tuberculosis miliar letal o en una meningitis tuberculosa.

La inmunidad celular confiere una protección parcial frente a *M. tuberculosis*, mientras que la inmunidad humoral no tiene un claro papel protector. Hay dos clases de células que son esenciales: los macrófagos que fagocitan directamente a los bacilos tuberculosos y las células T (principalmente linfocitos CD4+) que ejercen un papel protector gracias a la producción de linfocinas, en particular interferón gamma (IFN-).

Después de la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos alveolares segregan varias citocinas: interleucina (IL) 1, que contribuye a la aparición de fiebre; IL-6 contribuye a la hiperglobulinemia, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF)⁴⁴, que favorece la destrucción de las micobacterias, la formación de granulomas, y varios efectos generales, como la fiebre y el adelgazamiento. Los macrófagos también son esenciales para procesar y presentar los antígenos a los

⁴⁴ RIVAS-SANTIAGO, Bruno, VIEYRA-REYES, Patricia y ARAUJO, Zaida. Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar: Revisión. Invest. clín, dic. 2005, vol.46, no.4, p.391-412. ISSN 0535-5133.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

linfocitos T; el resultado es una proliferación de los linfocitos CD4+, que son fundamentales para la defensa del hospedador. Los defectos cualitativos y cuantitativos de las células CD4+ explican la incapacidad de los sujetos infectados por el VIH para detener la proliferación de las micobacterias. Los linfocitos CD4+ reactivos generan citocinas de tipo TH1 y participan en la destrucción de las células infectadas por *M. tuberculosis*. Las células CD4+ TH1 producen interferón gamma e IL-2, que estimulan la inmunidad celular. Las células TH2 generan IL-4, IL-5 e IL-10 y favorecen la inmunidad humoral. La interrelación de estas diversas citocinas y su regulación cruzada determinan la respuesta del hospedador. No está totalmente aclarada la utilidad de las citocinas en la destrucción intracelular de las micobacterias. El IFN- puede inducir la liberación de óxido nítrico y el TNF- también parece ser importante. Observaciones realizadas en ratones transgénicos sugieren que otros subgrupos de células T (en particular CD8+) restringidos por otras moléculas presentadoras de antígenos que contienen la subunidad de microglobulina 2, pudieran tener gran importancia. Los lípidos han sido incluidos en el reconocimiento micobacteriano por el sistema inmunitario innato, y finalmente

se ha demostrado que las lipoproteínas son señales de desencadenamiento potente a través de receptores de tipo Toll. Por último, es probable que en la protección intervenga un subgrupo de linfocitos T descubierto recientemente, capaz de reconocer los elementos lipídicos del bacilo que presentan las moléculas CD1. *Mycobacterium tuberculosis* posee varias proteínas que actúan como antígenos.⁴⁵

Algunas se encuentran en el citoplasma y la pared celular; otras se segregan. Estas últimas tienen más importancia como estimulantes de la reacción de los linfocitos T, como lo sugieren los experimentos que han demostrado la aparición de inmunidad protectora en los animales después de inmunizarlos con micobacterias vivas secretoras de la proteína. Entre los antígenos dotados de un posible papel protector se encuentra el antígeno de 30 kDa y el ESAT-6. Probablemente, la inmunidad protectora es el resultado de la capacidad de reacción frente a muchos antígenos micobacterianos distintos.

⁴⁵ Carballo Cruz Martín, Chavarría Mondragón Katya, Meza Morales Aurora. Inmunología y patogénesis de tuberculosis Alergia e Inmunol Pediatr 1995; 4(5) : 147-149.

Coincidiendo con la aparición de la inmunidad, surge la DTH a *M. tuberculosis*. Esta reactividad sirve de base a la prueba cutánea del PPD que, hoy en día, es la única prueba fidedigna que detecta la infección por *M. tuberculosis* en las personas sin síntomas. Los mecanismos celulares responsables de la reacción a la PPD guardan relación principalmente con los linfocitos CD4+ antes sensibilizados, que son atraídos hacia la región cutánea donde se realiza la prueba. Allí proliferan y producen sus citocinas. Aunque la DTH se vincula con la inmunidad protectora haciendo que las personas PPD-positivas sean menos sensibles a una nueva infección por *M. tuberculosis* que las personas PPD-negativas, de ningún modo confiere un papel protector ante una reactivación. De hecho, algunos casos de tuberculosis activa conllevan reacciones intensamente positivas a la prueba cutánea con PPD.

2.4.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La tuberculosis suele dividirse en pulmonar y extrapulmonar. Antes de que se conociera la infección por el VIH, más de 80% de todos los casos de tuberculosis se localizaban en los pulmones. Sin embargo, hasta dos tercios de los pacientes infectados por el VIH y que enferman de tuberculosis pueden padecer una enfermedad tuberculosa pulmonar y extrapulmonar, o sólo extrapulmonar.

Tuberculosis pulmonar

La tuberculosis pulmonar puede ser primaria o posprimaria (secundaria).

a) Tuberculosis primaria

La tuberculosis pulmonar primaria es la que aparece consecutivamente a la infección inicial por el bacilo tuberculoso. En las regiones con gran prevalencia de la tuberculosis, esta forma suele afectar a los niños y a menudo se localiza en los campos medios e inferiores de los pulmones.

Después de la infección suele aparecer una lesión periférica que conlleva adenopatías hiliares o paratraqueales que pueden pasar inadvertidas en la radiografía de tórax. En la mayor parte de los casos, la lesión cura espontáneamente y más tarde puede descubrirse por un pequeño nódulo calcificado (*lesión de Ghon*).^{25,28}

En los niños y en las personas inmunodeprimidas, como en los casos de desnutrición o de infección por el VIH, la tuberculosis pulmonar primaria puede agravarse rápidamente y producir manifestaciones clínicas. La lesión inicial se agranda y puede evolucionar de distintas maneras. Una manifestación frecuente es el derrame pleural, que se debe a la penetración en el espacio pleural de los bacilos procedentes de un foco subpleural adyacente. En los casos graves, la lesión primaria aumenta pronto de tamaño, se necrosa en su parte central, y forma pronto una cavidad (tuberculosis primaria progresiva). En los niños pequeños, la tuberculosis casi siempre conlleva adenopatías hiliares o mediastínicas que aparecen tras la propagación de los bacilos desde el parénquima pulmonar a los vasos linfáticos. Los ganglios afectados y agrandados pueden

comprimir los bronquios, obstruyéndolos y produciendo seguidamente un colapso segmentario o lobular. Si la obstrucción es parcial puede aparecer un enfisema obstructivo posiblemente seguido de la formación de bronquiectasias. La diseminación hematógena, un acontecimiento frecuente y muchas veces asintomático, puede ser la manifestación más grave de la infección primaria por *M. tuberculosis*. Los bacilos pasan desde la lesión pulmonar o los ganglios linfáticos al torrente sanguíneo y con ello se diseminan por varios órganos, donde producen lesiones granulomatosas. Aunque la curación es frecuente, las personas inmunodeprimidas, a veces sufren una tuberculosis miliar, una meningitis tuberculosa, o lo uno y lo otro.

b) Tuberculosis posprimaria

Llamada también tuberculosis secundaria, de reactivación, o de tipo adulto, la forma posprimaria se debe a la reactivación endógena de una infección tuberculosa latente, y suele localizarse en los segmentos apicales y posteriores de los lóbulos superiores, donde la gran concentración de oxígeno

favorece el crecimiento de las micobacterias. También suelen afectarse los segmentos superiores de los lóbulos inferiores. El grado de afección parenquimatosa varía mucho, desde pequeños infiltrados hasta un proceso cavitario extenso. Al formarse las cavernas, su contenido necrótico y licuado acaba pasando a las vías respiratorias, dando lugar a lesiones parenquimatosas satélites que también pueden acabar cavitándose. Cuando, debido a la confluencia de varias lesiones, se afecta masivamente un segmento o lóbulo pulmonar, el resultado es una neumonía tuberculosa. Si bien se señala que hasta 33% de los pacientes con tuberculosis pulmonar grave fallece pocas semanas o meses después del comienzo, otros experimentan un proceso de remisión espontánea o siguen una evolución crónica cada vez más debilitante ("consunción"). En esas circunstancias, algunas lesiones pulmonares se vuelven fibrosas y más tarde pueden calcificarse, pero las cavidades persisten en otras zonas de los pulmones. Los individuos que padecen estas formas crónicas siguen expulsando bacilos tuberculosos al exterior.

La mayoría de los pacientes responde al tratamiento con desaparición de la fiebre, disminución de la tos, aumento de peso y mejoría y bienestar general en varias semanas.

En las primeras fases evolutivas de la enfermedad las manifestaciones clínicas suelen ser inespecíficas e insidiosas, consistiendo ante todo en fiebre y sudores nocturnos, pérdida de peso, anorexia, malestar general y debilidad. Sin embargo, casi siempre acaba apareciendo tos (que al principio puede ser seca y después se acompaña de expectoración purulenta). Con frecuencia se advierten estrías de sangre en el esputo. A veces aparece una hemoptisis masiva ocasionada por la erosión de un vaso por completo permeable situado en la pared de una caverna, o bien consecutivamente a la rotura de un vaso dilatado en una caverna (*aneurisma de Rasmussen*) o a la formación de un aspergiloma en una caverna antigua. En los pacientes con lesiones parenquimatosas subpleurales a veces existe dolor precordial de tipo pleurítico, pero también puede deberse a la sobrecarga muscular causada por la tos persistente. Las formas extensas de la enfermedad pueden producir disnea y, en ocasiones, síndrome de insuficiencia

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

respiratoria aguda del adulto (*adult respiratory distress syndrome*, ARDS).

Los signos físicos son poco útiles en la tuberculosis pulmonar. Muchos pacientes no tienen cambios detectables en la exploración del tórax; en otros se oyen estertores inspiratorios en las zonas afectadas, especialmente después de toser. En ocasiones pueden oírse roncus originados por la obstrucción parcial de los bronquios, y el clásico soplo anfórico en las zonas con cavernas grandes. Entre los síntomas generales están la fiebre y la consunción. En algún caso aparecen palidez y acropaquias. Los datos hematológicos más frecuentes son anemia ligera y leucocitosis. También se ha descrito hiponatremia debida al síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética.^{25,28,46,47}

⁴⁶ Kasper, Hauser; Harrison, Principios de Medicina Interna 16th edición. McGrawHill. 2006.

⁴⁷ Farreras – Rozman. Medicina Interna, 15th edición. ELSEVIER. 2004.

CAPITULO III

HIPÓTESIS

La Tuberculosis Pulmonar es una enfermedad subdiagnosticada en nuestro país pues el único método de fácil acceso utilizado para su diagnóstico ha sido la Baciloscopia, la cual no logra detectar a todo los casos, en especial porque depende de la calidad de la muestra, la preparación de la misma, la experiencia del observador y la condición del paciente, pero con el advenimiento de nuevas técnicas de biología molecular como la RCP, que busca fragmentos de ADN de la Micobacteria de forma automática eliminando algunas debilidades de la Baciloscopia mejorara la detección de nuevos casis: por esto pensamos que la Baciloscopia es una prueba que genera falsos negativos los cuales si serían detectados por la técnica de RCP.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

1. Validar la Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa frente a la Baciloscopia detectada en esputo de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar atendidos en las Unidades de Salud del Ministerio de Salud Pública.

3.2 Objetivos Específicos

1. Calcular la sensibilidad y la especificidad de la Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (RCP) frente a la Baciloscopia (Ziehl Neelsen) en el diagnóstico de Tuberculosis Pulmonar, en esputo de pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en las Unidades Operativas del Ministerio de Salud Pública (MSP).
2. Establecer el índice de verosimilitud, (+) y (-) de la Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa frente a la Baciloscopia (Ziehl Neelsen) en el diagnóstico de Tuberculosis Pulmonar, en esputo de pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en las Unidades Operativas del Ministerio de Salud Pública (MSP).



CAPITULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. TIPO DE ESTUDIO

El estudio que realizamos en esta investigación es de validación de una prueba, la Reacción en Cadena de Polimerasa frente a la Baciloscopia para el diagnóstico de Tuberculosis Pulmonar en pacientes sintomáticos respiratorios.

4.2. ÁREA DE ESTUDIO

Los Centros de Salud del Área Urbana y Rural de Cuenca, en la provincia de Azuay, Ecuador.

4.3. UNIVERSO Y MUESTRA

El universo de nuestra investigación lo constituyeron todos los pacientes sintomáticos respiratorios que acudieron a las



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

unidades operativas de salud del MSP dentro del Programa de Control de la TB.

El tamaño de la muestra fue fijado propositivamente y por conveniencia se incluyeron 100 pacientes que acudieron a los Centros de Salud desde diciembre de 2008 a abril de 2009 fecha en la que se completó el número de muestras propuestas.

4.4. VARIABLES

Se consideraron variables de estudio a: edad, sexo y residencia de los pacientes a quienes se realizó las pruebas; y positividad y negatividad de las pruebas en estudio.

4.5. MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variables	Dimensión	Indicador	Escala
Edad Lapso transcurrido desde el nacimiento hasta la inclusión en el estudio	N/T	Años cumplidos	Interválica
Sexo Condición que diferencia al varón de la mujer	Femenino	Fenotipo	Categórica
	Masculino		
Residencia Domicilio habitual del investigador	Urbana	Registro	Categórica
	Rural		
Prueba Procedimiento técnico que confirma o descarta un diagnóstico	RCP	Positividad o Negatividad	Categórica
	Baciloscopia		

4.6 MÉTODOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

Las muestras fueron recolectadas por el personal de los centros de salud incluidos en el programa, de pacientes sintomáticos respiratorios, las que fueron retiradas diariamente de los centros de salud por los realizadores de la tesis; este procedimiento se realizó con todas las muestras de todos los pacientes sospechosos de tuberculosis que llegaron a los centros de salud en los meses antes mencionados.

La Baciloscopia fue realizada en el Centro de Salud y la RCP en un Laboratorio Particular donde se utilizó un test comercial.

La Baciloscopia fue realizada por el propio personal de los Centros de Salud los cuales el momento de retirar la muestra nos notificaban el resultado, a la vez que nos proporcionaron los demás datos del paciente. La Baciloscopia se realizó siguiendo el protocolo establecido por el MSP. (Anexo 2)

Para la realización de la prueba de RCP las muestras recolectadas se llevaron al laboratorio de Biología Molecular donde se proceso mediante un Test Comercial siguiendo las instrucciones contenidas en el empaque (Anexo 3).

4.7. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Una vez recopilada la información se ingresó en una matriz de datos de un programa de ordenador y se procesó los datos con estadística descriptiva.

Para las variables cualitativas y cuantitativas discretas se utilizó distribución de frecuencias en número de casos (n) y sus porcentajes (%). Para las variables cuantitativas continuas se utilizó promedio $\pm$ desviación estándar ($X \pm SD$).

Para el análisis de validación de la prueba utilizamos una tabla tetracórica y con la ayuda de un software de ordenador, el Epidat vers. 3.1 en español para Windows™ se realizó el cálculo de Sensibilidad, Especificidad, Razón Positiva de

verosimilitud (Likelihood Ratio +) y Razón Negativa de verosimilitud (Likelihood Ratio -).

4.8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dado que con este diseño se prioriza la validación de la prueba en sí, para la interpretación de los resultados consideramos los valores de sensibilidad, especificidad, razón positiva de verosimilitud y razón negativa de verosimilitud. No incluimos el valor predictivo positivo y negativo de la prueba porque éstas se utilizan más para valorar las pruebas a nivel de población con estrategias tipo cribaje (screening).

Sensibilidad. Proporción de la población sometida a la prueba que está verdaderamente enferma y que es identificada como tal por la prueba. La sensibilidad es una medida de la probabilidad de diagnosticar correctamente un caso, o la probabilidad de que cualquier caso dado sea identificado por la prueba (Sinónimo: tasa positiva verdadera).

Especificidad. Proporción de las personas verdaderamente no enfermas que son identificadas como tales por la prueba. Es una medida de la probabilidad de identificar correctamente a una persona no enferma con una prueba (Sinónimo: tasa negativa verdadera).

Razón Positiva de verosimilitud (Likelihood ratio +) y **Razón Negativa de verosimilitud** (Likelihood ratio -). Se trata de magnitudes o valores intrínsecos de la prueba clínica. Se calculan como un cuociente de probabilidades. Se los define estadísticamente como:

- Likelihood Ratio de Positivos: $LR+ = S / (1 - E)$
[Sensibilidad/100-Especificidad]
- Likelihood Ratio de Negativos: $LR- = (1 - S) / E$ [100-Sensibilidad/Especificidad]

LR+ mayor a 1 implica que ese resultado es más probable en pacientes con la enfermedad, y cuanto más alejado de 1, mayor es la probabilidad de observar ese resultado en un paciente enfermo, y más aumentará la probabilidad posprueba.

Generalmente entre 6 y 10 la probabilidad de la certeza diagnóstica es muy buena y por sobre el valor 10 es excelente.

A la inversa, si el LR- es menor a 1 la probabilidad de tener la enfermedad disminuye; así cuanto más pequeño sea el LR menor será la probabilidad posprueba de tener la enfermedad. De esto se desprende que un LR igual a 1 no cambia la probabilidad de enfermedad, o lo que es lo mismo, la probabilidad preprueba será igual a la posprueba.

Las relaciones de estos cuatro enunciados se analizaron en una tabla de 2 x 2:

<i>Resultado de la prueba diagnóstica</i>	<i>Ziehl-Neelsen</i>		<i>Total</i>
	<i>Positivo para la enfermedad</i>	<i>Negativo para la enfermedad</i>	
<i>RCP</i> <i>Positivo</i>	<i>a</i> <i>(verdaderos positivos)</i>	<i>b</i> <i>(falsos positivos)</i>	<i>a + b</i>

RCP <i>Negativo</i>	<i>c</i> <i>(falsos negativos)</i>	<i>d</i> <i>(verdaderos negativos)</i>	<i>c + d</i>
Total	<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	<i>a + b + c + d</i>

4.9. ASPECTOS ÉTICOS

Respetamos la confidencialidad de los pacientes, la única información usada fue la edad, sexo, residencia y los resultados proporcionados por el Centro de Salud, información que adicionalmente se trató con de carácter de confidencial. Para la recopilación de la muestra el único procedimiento que realizó el paciente fue toser en un envase.

La confidencialidad de los datos se logró mediante etiquetar los frascos con códigos y no con los nombres del paciente. No se administró ningún tipo de sustancia a los pacientes adultos, niños, mujeres embarazadas y ancianos.

CAPITULO V

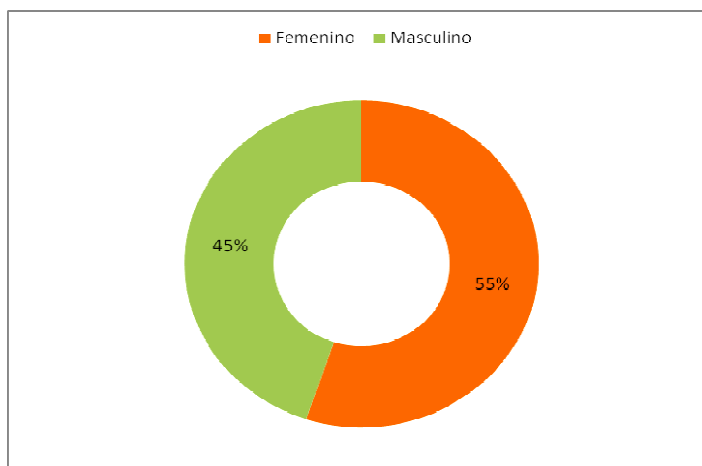
RESULTADOS

5.1. CUMPLIMIENTO DE LA MUESTRA Y VARIABLES DEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN

Se estudiaron 100 muestras de pacientes en las que se realizó Baciloscopia y RCP. Las muestras provinieron el 45% de varones y 55% de mujeres. (Gráfico 1)

Gráfico 1

Estudio de 100 muestras de esputo distribuidas según sexo.



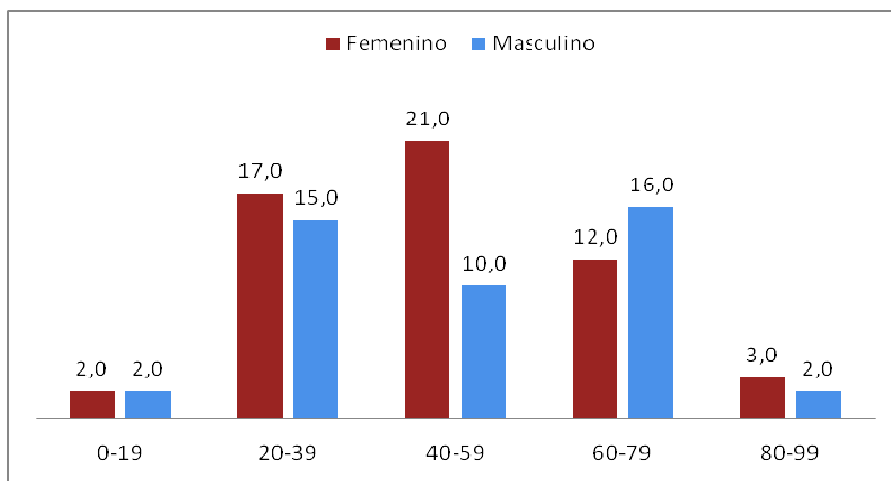
Fuente: formularios de recepción de muestras

Elaboración: autores del trabajo

La edad promedio del grupo fue de $49.32 \pm 23,5$ años, con rango de 4 a 92. La mayor parte de los pacientes se situó entre los 20 y 59 años. (Grafico 2)

Grafico 2

Estudio de 100 muestras de esputo distribuidas según edad agrupado por sexo



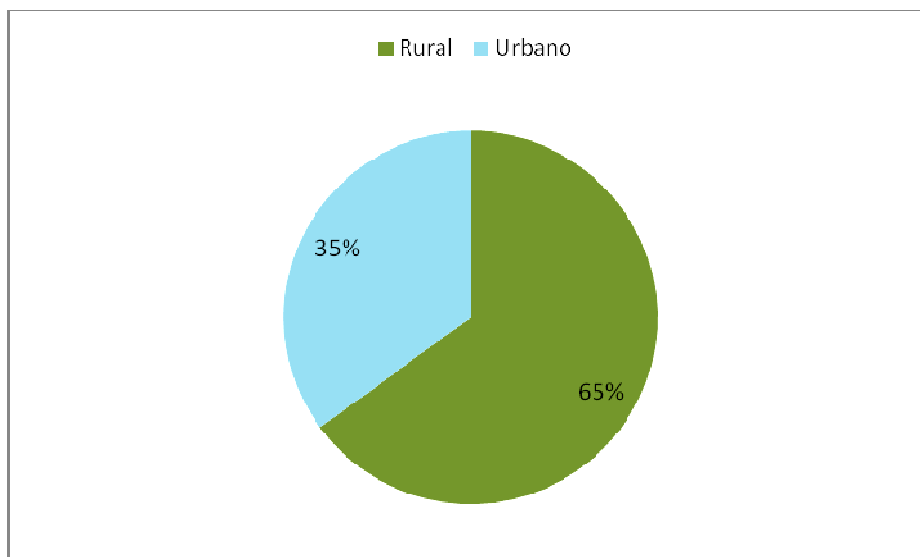
Fuente: formularios de recepción de muestras

Elaboración: autores del trabajo.

Las 100 muestras analizadas fueron esputo, cada una de un paciente diferente. El 65% de los pacientes tenían como lugar de residencia el área rural. (Grafico 3)

Grafico 3

Estudio de 100 muestras de esputo distribuidas según sector de residencia



Fuente: formularios de recepción de muestras

Elaboración: autores del trabajo.

Para la Baciloscopia el 1% de las muestras resultaron positivas con esta técnica, en tanto que con la RCP el 28% fueron positivas. (Grafico 4)

5.2. ANÁLISIS DE LA PRUEBA

Tabla 1

Sensibilidad, Especificidad, Razón de verosimilitud (+) y Razón de Verosimilitud (-) de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), frente a la Baciloscopia (Ziehl-Neelsen)

Nivel de confianza: 95,0%		BAAR		
Prueba diagnóstica		Enfermos	Sanos	Total
-----	-----	-----	-----	
PCR	Positivo	1	27	28
PCR	Negativo	0	72	72
-----	-----	-----	-----	
Total		1	99	100
Valor		IC (95%)		
-----	-----	-----	-----	-----
Sensibilidad (%)		100,00	50,00	100,00
Especificidad (%)		72,73	63,45	82,01
Razón de verosimilitud +		3,67	2,66	5,06
Razón de verosimilitud -		-	-	-



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Fuente: formularios de recepción de muestras y resultado de laboratorio.

Elaboración: autores del trabajo.

La prueba de PCR tuvo la máxima sensibilidad, del 100% (IC95% 50 – 100) y una especificidad del 72,73% (IC95% 63,45 – 82,01).

La razón positiva de verosimilitud fue de 3,67 (IC95% 2,66 – 5,06) y la razón negativa no pudo calcularse porque el numerador fue 0 (Véase fórmula de LR-).



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue validar la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa frente a la prueba de Baciloscopia, con tinción de Ziehl-Neelsen, en el diagnóstico confirmatorio de la Tuberculosis.

Pese a la alta prevalencia de Tuberculosis en nuestros países en vías de desarrollo no se dispone hasta hoy de un método único e infalible para evitar un error o una imprecisión diagnóstica. De otro lado la falta de personal debidamente capacitado así como de laboratorios y equipo, el costo de los servicios y la dificultad para realizar un seguimiento a los pacientes, constituyen factores que limitan no sólo la capacidad diagnóstica sino la cobertura efectiva en cuanto a la terapéutica de esta infección tan antigua como el hombre y de prevalencia recrudecida en estos últimos diez años merced a otras condiciones que facilitan su presencia como el caso del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

Durante los últimos años se han realizado notables avances en el perfeccionamiento de las técnicas moleculares aplicables en las áreas de inmunología, diagnóstico y genética. La técnica de Reacción en cadena por la Polimerasa (RCP), ideada por K. Mullis en 1983, perfeccionada por Saiki (1985), White y Erlich en 1989, tiene grande importancia y ventajas en el diagnóstico de varias enfermedades virales como New Castle, Gumboro, Bronquitis, por protozoarios como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium* y bacterianas como salmonellosis, mycoplasmosis, colibacilosis, tuberculosis, cólera, caracterizándose por ser una prueba de alta especificidad y sensibilidad en la detección de microorganismos patógenos.

Una de las ventajas del RCP es la detección rápida y específica de los ácidos nucleicos de microorganismos patógenos en una muestra problema, con la característica de tener una alta especificidad y sensibilidad. La prueba permite una obtención rápida de resultados y se pueden examinar varias muestras en corto tiempo.

En el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis la RCP es considerada una importante contribución. El diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar y micobacteriosis se hace fundamentalmente por el cultivo y la posterior identificación de la micobacteria por pruebas bioquímicas, así como por Baciloscopia para el primer caso. El cultivo de micobacterias presenta limitaciones, especialmente, por el tiempo de incubación que puede tardar hasta 12 semanas y por la sensibilidad para determinar la presencia del microorganismo. La reacción en cadena de la polimerasa es una prueba rápida.

En el Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia, se realizó entre junio del 2005 y agosto del 2006 un estudio en el que se procesaron 57 muestras clínicas provenientes de 15 centros hospitalarios del país, analizadas por RCP para la secuencia de inserción IS6110 y para el gen hsp65. Los resultados de amplificación fueron positivos en 6 pacientes lo que les llevó a pensar en tuberculosis extrapulmonar⁴⁰.

La disminución del tiempo en el diagnóstico contribuye a la instauración de tratamientos oportunos lo cual es particularmente importante si se trata de patologías infecciosas⁴¹.

En otro estudio se reporta que se incluyeron 31 muestras de esputo, provenientes de pacientes de ambos sexos, sin distinción de grupo étnico y edades comprendidas entre los 17 y 80 años, con manifestaciones clínicas, hallazgos radiológicos y datos epidemiológicos sugestivos de tuberculosis pulmonar. A todas las muestras se les practicó Baciloscopia utilizando la técnica de coloración de Ziehl-Neelsen y los objetivos para el ensayo de RCP fueron los genes que codifican la proteína de 32-Kda con la secuencia de inserción IS6110. Del total de muestras examinadas por el método de Ziehl-Neelsen, 19 resultaron positivas y 12 negativas (61,29 y 38,71 por ciento respectivamente). De las 31 muestras sembradas, 19 (61,29 por ciento) resultaron positivas y 12 (38,71 por ciento) fueron negativas al cultivo. De todas las muestras amplificadas, 22 (70,96 por ciento) mostraron la presencia de fragmentos de ADN correspondientes tanto a la secuencia de inserción

IS6110, como al antígeno alfa 32 KDa, mientras que en 9 (29,04 por ciento) no se detectó la presencia de ADN micobacteriano por el método de RCP. La sensibilidad de la prueba RCP fue virtualmente de 100 por ciento y su especificidad fue del 75 por ciento. Se demostró que el RCP, basado en la amplificación simultánea del elemento de inserción IS6110 y del gen que codifica el antígeno alfa en un solo paso, puede identificar infecciones por micobacterias a partir de muestras de esputo. Los investigadores concluyeron que esta técnica es más sensible que los procedimientos bacteriológicos de rutina (examen directo y cultivo) y la convierten en una herramienta muy poderosa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y otras enfermedades⁴².

Un estudio muy similar al nuestro llevado a cabo en México, en el cual se procesaron 234 muestras tanto por el método de RCP como de Baciloscopia mediante tinción de Ziehl-Neelsen; de las cuales 12 (5,1%) fueron positivas en la RCP y la Baciloscopia, 174 (74,4%) negativas en ambas pruebas, 47 (20,1%) positivas en la RCP y negativas la Baciloscopia y 1 (0,4%) negativa en la RCP y positiva en la

Baciloscopia; tomando la Baciloscopia como prueba de referencia, la RCP proporcionó una sensibilidad de 92,3%, una especificidad de 78,7% ⁴³.

En nuestros resultados, mostrados en la tabla 1, la sensibilidad para la prueba de RCP fue del 100% (IC95% 50,0 – 100) y la especificidad del 72,73% (IC95% 63,4 – 82,1). La elevada sensibilidad tiene relación con una razón positiva de verosimilitud (Likelihood Ratio +) del 3,67 (IC95% 2,6 – 5,06). A decir de los expertos este valor es compatible con una buena capacidad diagnóstica.

Como vemos los resultados obtenidos en nuestro estudio son muy similares a los obtenidos en el estudio de México; sin embargo las diferencias se las puede atribuir a fallos en la lectura de las placas en la Baciloscopia y en el caso de una especificidad baja a que el RCP da falsos negativos por detección cruzada a otros tipos de Micobacterias no Tuberculosas.

Sea como fuese, de acuerdo a la literatura publicada la RCP se presenta como una prueba capaz de detectar más

casos que la Baciloscopia, sin embargo cabe la duda que si estos casos positivos son en realidad casos de TB pulmonar, esta duda surge ya que ciertos investigadores indican que por la alta sensibilidad del RCP pueden ocurrir falsos positivos con otras micobacterias en la mayor parte de los casos debido a que los protocolos requieren manipulación para la extracción del ADN y esto hace que las muestras sean propensas a la contaminación cruzada, otros obstáculos al éxito de la técnica son dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción del ADN, y la presencia de inhibidores de la RCP⁴⁴.

Una ventaja adicional de la prueba RCP sobre la Baciloscopia es que la experiencia del observador no altera el resultado ya que este depende de ver una placa de gel de agarosa que en caso de mostrar fluorescencia en el lugar correspondiente para *M. tuberculosis* es positivo sin ninguna duda. Además el método es casi por completo automatizado, a diferencia que la Baciloscopia en que la tinción es hecha manualmente y esto determina la calidad de la placa y su posterior lectura. Por estos hechos de tipo técnico y de método

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

la RCP se perfila como un procedimiento superior a la Baciloscopia.

Finalmente, una temprana y oportuna detección de pacientes con tuberculosis pulmonar y extrapulmonar que permita iniciar el tratamiento lo antes posible disminuirá notablemente los posibles contagios y de hecho los costos adicionales al paciente y al círculo que lo rodea desde del punta de vista del contagio. De esta manera invertimos en diagnóstico y ahorramos en tratamiento, porque el objetivo es romper la cadena en un eslabón débil como lo es la prevención y no en un eslabón difícil como es el tratamiento⁴⁵.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El descubrimiento de la quimioterapia efectiva para erradicar la tuberculosis trajo consigo la creencia que sería fácilmente erradicable. Sin embargo, el tiempo ha demostrado lo contrario y la conjunción de factores psicosociales, epidemiológicos, administrativos y operativos han hecho que la tuberculosis se haya transformado en una verdadera plaga para el hombre.
- Indiscutiblemente, un factor que contribuye a esa persistencia de la tuberculosis, que continúa matando cerca de dos millones de víctimas por año, sigue siendo la inexactitud en el diagnóstico, por lo que se hace necesario el uso de herramientas de diagnóstico adecuadas.
- La gran diferencia de resultados obtenidos en nuestro estudio entre la Baciloscopía (una muestra positiva) y la

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

técnica de reacción en cadena de la polimerasa (28 muestras positivas) es debida fundamentalmente a que la Baciloscopía es una técnica operador dependiente, la cual estaría altera si quien la realiza la prueba no tiene la capacitación ni la experiencia necesaria para detectar los bacilos, lo cual explicaría el número bajo de detección que se realizo con esta prueba; por otro lado la PCR puede detectar tipos diferentes de *Mycobacterium* que resultarían en falsos positivos en nuestro estudio.

- La RCP aparece como un estudio efectivo para detectar *Mycobacterium tuberculosis*. Debería recomendarse al Ministerio de Salud Pública su implementación como prueba rutinaria en la detección de nuevos casos como apoyo a las Baciloscopia

CAPITULO VIII

ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLOS DE PROCESAMIENTO DE LA BACILOSCOPIA

Baciloscoopia: ha sido una técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de la tuberculosis, en la detección de casos y control de tratamiento. Con un costo bajo y de rápida ejecución.

1. Verter sobre el frotis previamente fijado, de 10 a 15 gotas de carbol fucsina.
2. Calentar hasta emisión de vapores. Repetir 1 a 4 veces el mismo procedimiento.
3. Decolorar con alcohol clorhídrico (HCl-etanol).
4. Lavar con agua.
5. Teñir con azul de metileno, durante un minuto.
6. Lavar con agua y dejar secar.
7. Examinar al microscopio con objetivo de inmersión.

Informe de resultados.



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA**

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Negativo: no se observan BAAR en 100 campos observados.

Positivo +: se observan menos de un bacilo por campo en promedio en 100 campos observados.

Positivo ++: se observan de 1 a 10 bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.

Positivo +++: Se observan más de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados.

ANEXO 2

PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE LA REACCIÓN DE CADENA DE LA POLIMERASA

1.- Extracción: DNG-Plus, detección cualitativa del *Mycobacterium tuberculosis* en muestra de Esputo en humanos, mediante RCP.

- Precalentar el baño Maria a 95°C
- Incubar 100ul de esputo homogenizado a 95°C por 20min.
- Estabilizar la solución DNG a temperatura ambiente por 20min.
- Añadir 400ul de la solución DNG al esputo
- Voltar 5seg.
- Añadir 400ul de Isopropanol y mezclar por inversión
- Incubar 20min a -20°C
- Centrifugar 10min a 10.000 rpm y desechar el sobrenadante
- Añadir 1ml de Etanol 75%
- Mezclar por inversión y centrifugar 5 min.

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

- Repetir el lavado con etanol una vez más
- Colocar el botón a secar en baño María a 65°C con el tubo abierto
- Disolver el botón celular con 50ul de agua destilada
- Colocar a 65°C por 5min
- Centrifugar 30seg.

Una vez extraída la muestra puede almacenarse hasta 24 horas en refrigeración.

2.- Amplificación: En un tubo Ependorf pequeño colocar, por muestra:

Mix	20ul
Taq	0,3ul
Muestra	5ul
Control positivo	2ul

Termociclador (duración: 1 hora), ciclos de calentamiento y enfriamiento:

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

93°C	60 seg	1 CICLO
72°C	30 seg	
93°C	20 seg	37 CICLOS
72°C	30 seg	
93°C	20 seg	1 CICLO
72°C	120 seg	

3.- Análisis de los resultados:

3.1.- Preparación del gel de agarosa al 2%:

- Pesar 1gr de agarosa
- Diluir con 50ml de TBE 0.5X
- Añadir 1ul de Bromuro de etidio y homogenizar
- Colocar el peine para obtener los pocillos y dejar solidificar por 20min

3.2.- Corrido:

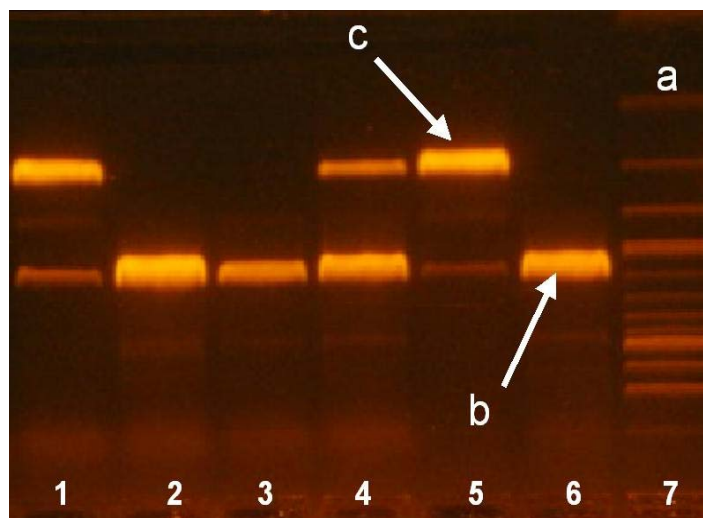
- Llevar el gel a la cámara de electroforesis, la cual contiene buffer (TBE 0.5X) que facilita la migración de los pares de bases.

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

- Colocar 10ul de la muestra en el pocillo correspondiente y realizar el corrido por 15min.
- Observamos con luz UV el nivel de las bandas

La presencia de una banda a 163 pb indica que la muestra es positiva para *Mycobacterium tuberculosis* (toda banda que este al mismo nivel que el control positivo, se considera positiva).

Electrophoresis of RCP products in *M. tuberculosis* diagnostics



a) 100 p.b. ladder

b) Internal control

c) *M. tuberculosis* DNA segment

Positive samples: 1,4 Negative samples: 2,3

Positive control: 5 Negative control: 6



Universidad de Cuenca

**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA**

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

100p.b. ladder: 7, la fecha c indica una alta concentración a la alta de 163pb lo que lleva a la conclusión de positivo.

Fuente:

<http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=23>

ANEXO 3

INFORMACIÓN ADICIONAL

Tabla 1

Estudio de 100 muestras de esputo distribuidas según sexo.

Sexo	
Femenino	55%
Masculino	45%
Total	100%

Fuente: formularios de recepción de muestras

Elaboración: autores del trabajo.

Tabla 2

Estudio de 100 muestras de esputo distribuidas según edad agrupado por sexo

Edad	Femenino	Masculino	Total
0-19	2%	2%	4%
20-39	17%	15%	32%
40-59	21%	10%	31%
60-79	12%	16%	28%
80-99	3%	2%	5%
Total	55%	45%	100%

TEMA: Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Fuente: formularios de recepción de muestras

Elaboración: autores del trabajo.

Tabla 3

Estudio de 100 muestras de esputo distribuidas según sector de residencia

Sector	
Rural	65%
Urbano	35%
Total	100%

Fuente: formularios de recepción de muestras

Elaboración: autores del trabajo.

Tabla 4

Estudio de 100 muestras de esputo distribuidas según el resultado de Baciloscopia y RCP

	RCP	Baciloscopia
Positivo	28%	1%
Negativo	72%	99%
Total	100%	100%

Fuente: formularios de recepción de muestras

Elaboración: autores del trabajo.

ANEXO 4 Foto 1



Termociclador

Autor: realizadores del trabajo

Foto 2



Cámara de flujo laminar

Autor: realizadores del trabajo

Foto 3



Vortex

Autor: realizadores del trabajo

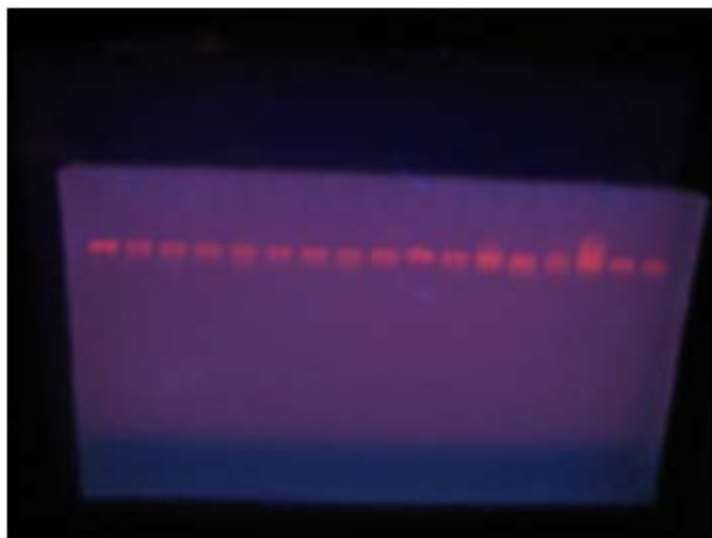
Foto 4



Electroforesis laminar

Autor: realizadores del trabajo

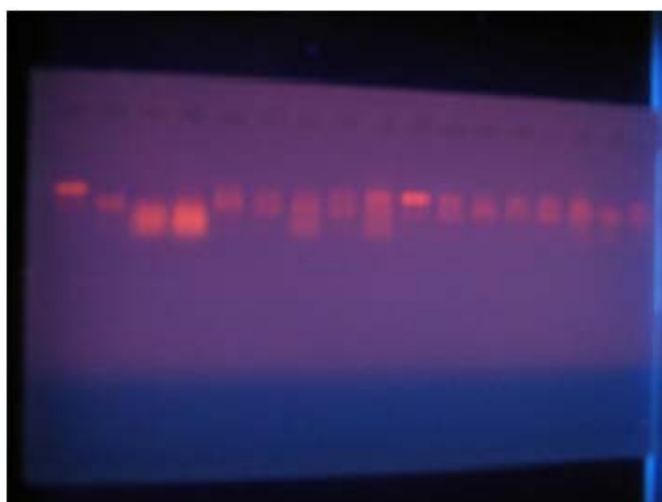
Foto 5



Gel de agarosa

Autor: realizadores del trabajo

Foto 6



Cámara de flujo laminar

Autor: realizadores del trabajo



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE MEDICINA

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. Bloom, Barry R. *Tuberculosis -- The Global View. N Engl J Med* 2002 346: 1434-1435
2. Bresky R Gustavo, Silva Z Nelly, Madariaga G Juan. *Esofagitis tuberculosa en un paciente HIV positivo. Rev. méd. Chile [serial on the Internet]. 2007 Oct [cited 2009 July 05]; 135(10): 1323-1326.*
3. Capcha A, Luis, URBINA B, Martha, VASQUEZ C, Lucy et al. *Perfiles genéticos (IS6110) y patrones de resistencia en aislamientos de M. tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. Lima Sur, Perú. Rev. Perú. med. exp. salud pública, Ene./mar. 2005, vol.22, no.1, p.4-11. ISSN 1726-4634.*
4. Carballo Cruz Martín, Chavarría Mondragón Katya, Meza Morales Aurora. *Inmunología y patogénesis de tuberculosis* Alergia e Inmunol Pediatr 1995; 4(5): 147-149.

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

5. *Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, and Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine bacteriology laboratory. J Clin Microbiol 1993; 31:2049-2056.*
6. *D'Alessandro Adriana, de Waard Jacobus H. Evaluación de dos pruebas comerciales para el serodiagnóstico de la tuberculosis pulmonar. Rev. chil. infectol. 2008 Feb [citado 2009 Jul 05]; 25(1): 37-40.*
7. *Edgardo Cruz M. y Gonzalo Valdivia C. Jornadas de invierno. Rev. chil. enferm. respir. vol.22 no.3 Santiago Sept. 2006*
8. *Eisenach KD, Cave MD, Crawford JT. RCP detection of Mycobacterium tuberculosis. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, eds. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. pp. 191-196.*

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

9. *Espinosa, A. Identificación rápida de mutaciones puntuales en el gen KatG en la identificación de M. tuberculosis. Rev Neumología Perú. 2004. Vol 48, 2:131-138.*
10. *Farreras – Rozman. Medicina Interna, 15th edición. ELSEVIER. 2004.*
11. *García, Luis Fernando and Jaramillo, Ernesto. La tuberculosis: un reto que debemos enfrentar. Biomédica, June 2004, vol.24 suppl.1, p.5-8. ISSN 0120-4157*
12. *HIV-TB Spreads In Africa, Undermines Control Of World's Two Deadliest Infectious Diseases, Rev. ScienceNews. Nov. 4, 2007, 44:032.*
13. *Jasmer, Robert M., Nahid, Payam, Hopewell, Philip C. Latent Tuberculosis Infection N Engl J Med 2002 347: 1860-1866*
14. *Kasper, Hauser; Harrison, Principios de Medicina Interna 16th edición. McGrawHill. 2006.*
15. *Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA: U.S.*

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.

16. Kiriwara JM, Hillier SL, Coyle MB. Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J Clin Microbiol* 1985; 22:841-845.
17. Lado Lado, FL, v. Tuñez Bastida, a. L. Golpe Gómez*, a. Cabarcos Ortiz de barrón, m. L. Pérez del molino. *Tuberculosis en pacientes ancianos. Formas de presentación. 2002. AN. MED. INTERNA (Madrid) Vol. 19, N.º 3, pp. 111-114*
18. Laniado, R. Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 14 (1): 22 – 26. 2001.
19. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Levy-Frebault VV. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2476-2478.

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

20. *Llaca Día Jorge, Flores Aréchiga Amador, Martínez Guerra María y Cantú Martínez Mario. Rev. Salud pública y nutrición. 2003. Vol 4 No.3 Julio-Septiembre.*
21. *Manual de normas técnicas, métodos y procedimientos para el control de la tuberculosis. 1ra. ed. Quito. MSP. 2002. Págs.: 1-3, 15-1.*
22. *Menzies, Dick Tuberculosis: Current concepts and treatment N Engl J Med 2000 343: 1819*
23. *Miller, N., Cleary, T., Kraus, G., Young, A. K., Spruill, G., Hnatyszyn, H. J. (2002). Rapid and Specific Detection of Mycobacterium tuberculosis from Acid-Fast Bacillus Smear-Positive Respiratory Specimens and BacT/ALERT MP Culture Bottles by Using Fluorogenic Probes and Real-Time RCP. J. Clin. Microbiol. 40: 4143-4147*
24. *Miranda G Gonzalo, Díaz P Juan Carlos, Arancibia H Patricia, Antolini T Monica, Díaz G Carolina, Vidal F Alvaro. MANIFESTACIONES RADIOGRAFICAS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR. Rev. chil. radiol. [revista en la Internet]. 2004 [citado 2009 Jul 05] ; 10(4): 178-*

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

182.OMS, Global Tuberculosis Control, 2007.

www.who.int/mediacentre/factsheet/fs104/es/index.html

25. *MJ Garcia Pais, MT Rigueiro Veloso, E Casariego Vales, JC Corredoira Sánchez, J Valera Otero, JF Garcia Rrodriguez, Tuberculosis, Guías Clínicas, 2003; 3(25).Rrodriguez, Tuberculosis, Guías Clínicas, 2003; 3(25).*
26. *MSP, Número de casos y tasas de incidencia anual de tuberculosis pulmonar bk+ y bk- según Provincias y regiones - ecuador 2000 – 2007. Disponible en:<http://www.msp.gov.ec/images/tuberculosis%20pulmonar.pdf>*
27. *MSP, Programa del Control de la Tuberculosis, Estadísticas actuales, 2008. Disponible en:http://www.msp.gov.ec/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=50&Itemid=143*
28. *Nolte FS, Metchok B, McGowan JE Jr, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase*

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol
1993;31: 1777-1782

29. Organización Panamericana de la Salud. El control de la tuberculosis en las Américas. Boletín Epidemiológico. OPS. 1998; 19(2):1-8.
30. Pérez Emilio. Tuberculosis en Euskadi. XVIII Jornadas de Pediatría de Álava. Vitoria, 10 de noviembre de 2006.
31. Rafael Laniado-Laborí, Martha Livier Enríque, Alexei Fedórovish Licea Navarroll, Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2001, Vol 14, 1:22-26
32. Ramón Fúnez Solórzano*, Cecilia Varela-Martínez+, Métodos Diagnósticos en Tuberculosis: lo convencional y lo nuevo. Rev. Med. Hondur. 2006, 74:93-101.
33. Ridzon, Renee. Tuberculosis. N Engl J Med 2004 351: 2024

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

34. *Rivas-Santiago, Bruno, Vieyra-Reyes, Patricia y ARAUJO, Zaida. Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar: Revisión. Invest. clín, dic. 2005, vol.46, no.4, p.391-412. ISSN 0535-5133.*
35. *Romero N, Martín M. C Intervención en tuberculosis pulmonar en una comunidad andina en Ecuador a través de la estrategia TAES/DOTS centrada en la comunidad. Cerdanyola del Vallès: GRAAL, Unitat de Bioestadística, Universitat Autònoma de Barcelona; 2007. Informe nº: GR-UAB-07-2.*
36. *Sommers HM, McClatchy JK. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Morello JA, ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1983.*
37. *Wanger, A., R. Clark, J. Bua, A. Edwards, and J. Ho. 1996. Comparison of MB/BacT and conventional methods for detection of mycobacterium species, abstr. U-40, p. 107. In Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*

TEMA: Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en sintomáticos respiratorios, Cuenca 2009.

38. *WHO, Comunicado de prensa conjunto de la OMS, la Alianza Alto a la Tuberculosis y el Banco Mundial, 2 de diciembre de 2007|Washington, D.C*
39. *WHO, Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. WHO Report 2009. WHO/HTM/TB/2009.411.*
40. *Puerto G, Castro CM, Ribón W. Polymerase chain reaction (PCR): a contribution for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis and micobacteriosis. Infectio 2007; 11(2): 87-94.*
41. *Chakravorty S, Sen MK, Tyagi JS. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. J Clin Microbiol. 2005;43:4357-62.*
42. *Nava Paz, Orlando; Hassanhi, Manzur; Prieto, Lisbeth, Evaluación de la bacilospocia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Kasmera;33(2):119-131, jul.-dic. 2005. tab.*

43. *Morán Moguel María Cristina, Aceves Hernández Dolores, Peña Montes de Oca Patricia Maribel, Gallegos Arreola Martha Patricia, Flores Martínez Silvia Esperanza, Montoya Fuentes Héctor et al. Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. Rev Panam Salud Publica. 2000 June; 7(6): 389-394.*
44. *Nagesh BS, Sehgal S, Jindal SK, Arora SK. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in pleural fluid. Chest .2001;119:1737-41.*
45. *Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. Am Fam Physician. 2005;72:1761-8.*
46. *Shafer RW, Kim DS, Weiss JP, Quale JM. Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Medicine (Baltimore). 1991;70:384-97.*