

**DESEMPEÑO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)
CASERA IS6110 EN EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y
EXTRAPULMONAR EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.**

ANGELA YOHANA TORRES LOPEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

**DESEMPEÑO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)
CASERA IS6110 EN EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y
EXTRAPULMONAR EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA.**

ANGELA YOHANA TORRES LOPEZ

Trabajo de grado presentado para optar al título de Bióloga

**Directora:
MARIA LILIA DIAZ BETANCOURT
Médica Internista-Infectóloga
Profesora del Departamento de Patología**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Directora: _____
Dra. Maria Lilia Díaz B.

Jurado: _____
Mag. Silvio Carvajal

Jurado: _____
Dr. Harold Bolaños

Fecha de Sustentación: Popayán 8 de Septiembre de 2009.

DEDICATORIA

Por que creo que la vida nos regala muchas oportunidades dedico este logro:

A Dios por darme el privilegio de la vida, colmarme diariamente de bendiciones y mostrarme la luz del camino.

A mis padres Carlos y Luz Ángela por hacer de mí lo que soy, por su cariño, comprensión, entusiasmo, apoyo incondicional y por querer y cuidar mucho a mi hijo.

A mis hermanos Yovani y Andrés por brindarme su voz de apoyo incondicional.

A mi hijo Juan David, por ser la fuerza y la razón de mi vida, que día tras día me motiva a seguir recorriendo los caminos de la vida con fortaleza y entereza.

A mis amigos Magnolia Carvajal y Giovaní Palta, por su compañía en los buenos y malos momentos, y por ser amigos de verdad.

A Mirtha, Gloria, Victoria, Catalina y Mabel, por ser un apoyo y voz de aliento para no desfallecer en el transcurso de este trabajo.

A mi directora de tesis, a mis jurados y a todas las personas que de una u otra manera me ayudaron en esta travesía.

A mi Universidad y todos aquellos que la componen, por ser los gestores de nuestros sueños y por permitirnos convertirlos en realidad.

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GENERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	6
3.1 GENERALIDADES	6
3.2 EPIDEMIOLOGIA	7
3.3 COMPORTAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EN COLOMBIA 2007	8
3.4 TRANSMISION	10
3.5 ASOCIACIÓN ENTRE VIH Y TB	11
3.6 FORMAS DE PESENTACIÓN DE LA TUBERCULOSIS	12
3.6.1 TUBERCULOSIS PULMONAR	12
3.6.2 TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR	15
3.6.2.1 TB miliar	16
3.6.2.2 TB del sistema nervioso central	17
3.6.2.3 Pericarditis tuberculosa	17
3.6.2.4 TB osteoarticular	17
3.6.2.5 TB genitourinaria	18
3.6.2.6 Peritonitis tuberculosa	20
3.6.2.7 Linfadenitis tuberculosa (escrófula)	21
3.6.2.8 Otras formas de TB	22
3.7 INFECCION VIH (VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA) Y TB	22
3.8 TUBERCULOSIS INFANTIL	23
4. DIAGNÓSTICO	26

4.1 CRITERIO MICROBIOLÓGICO	26
4.1.1 Baciloscopia	26
4.1.1.1 Ziehl-Neelsen (ZN)	26
4.1.1.2 Tinción de Kinyoun	27
4.1.1.3 Auramina	27
4.1.2 Cultivo	28
4.1.2.1 Cultivo Ogawa-Kudoh (OK)	28
4.1.2.2 Medios de cultivo líquido	29
4.1.2.3 Radiométricos	29
4.1.2.4 No radiométricos	30
4.1.2.5 Medios de cultivo bifásico no radiométrico (MBSeptiCheck)	30
4.1.2.6 Hemocultivos	30
4.1.2.7 Nuevas técnicas de Identificación	30
4.2 Criterio Clínico	31
4.3 Criterio Histopatológico	31
4.4 Criterio Radiológico	32
4.5 Criterio Inmunológico	32
4.5.1 Prueba tuberculínica y VIH	35
4.5.2 Ensayos de liberación de citoquinas	35
4.5.3 Diagnóstico serológico	36
4.6 Otros procesos coadyuvantes del diagnóstico	37
4.7 Técnicas de Biología Molecular	37
4.7.1 Técnicas de hibridación	37
4.7.2 Técnicas de amplificación	38
4.7.2.1 Secuencia IS6110 (elemento móvil de ADN)	42
4.7.2.2 LIMITACIONES DEL PCR	47
5. METODOLOGÍA	49
5.1 TIPO DE ESTUDIO	49

5.1.1 Criterios de Inclusión	49
5.1.2 Criterios de Exclusión	50
5.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	50
5.2.1 Muestras para el PCR casero IS6110	50
5.2.2 Extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i>	51
5.2.3 Amplificación de ADN	51
5.2.4 Detección del producto obtenido en la amplificación de ADN de <i>M. tuberculosis</i>	52
5.2.5 Búsqueda de inhibidores	52
5.3 ANALISIS	52
6. RESULTADOS	54
7. DISCUSIÓN	60
8. BIBLIOGRAFÍA	64
9. ANEXOS	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Indicaciones de la Sociedad Torácica Americana de interpretación PPD.	35
Tabla 2. Patologías de pacientes no TB	54
Tabla 3. Características sociodemográficas de la población.	55
Tabla 4. PCR versus ZN y cultivo.	56
Tabla 5. Resultados de PCR, ZN y cultivo según forma de presentación de la TB	57
Tabla 6. Tipos de muestras de pacientes con TB establecida	58
Tabla 7. Tipos de muestras de pacientes con TB clínica	59
Tabla 8. Sensibilidad, Especificidad, VPP y VPN del PCR, el ZN y el cultivo	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia de tuberculosis por 100.000 habitantes, Colombia, 1987-2006.	9
Figura 2. Tinción de Ziehl-Neelsen de esputo positivo para micobacterias.	27
Figura 3. Cultivo de <i>M. Tuberculosis</i>	28
Figura 4. Inyección intradérmica de PPD para la realización del test de Mantoux.	33
Figura 5. PCR y detección del producto por electroforesis en gel de agarosa	40
Figura 6. Año de ingreso de los pacientes con TB y no TB.	55
Figura 7. Procedencia de los pacientes con TB y no TB.	57

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, que constituye un problema grave de salud pública en los países en desarrollo. En el mundo ocurren 8,8 millones de casos/año y se mueren 1,7 millones de personas. El programa nacional para el control de TB en Colombia basa la confirmación diagnóstica de los enfermos pulmonares en la tinción de tres muestras de esputo y con esta técnica se puede diagnosticar 50 – 75% de los casos pulmonares y del 0 - 20% de los extrapulmonares. Uno de los problemas que persiste hoy día y obstaculiza el control de la TB es la dificultad para establecer rápidamente el diagnóstico antes que el enfermo transmita la infección a otros individuos. Con frecuencia el diagnóstico de TB se realiza teniendo en cuenta diversos criterios como la presentación clínica, radiológica, histopatológica, inmunológica y epidemiológica, ya que el criterio microbiológico que es el definitivo es muchas veces negativo. Los métodos microbiológicos son la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) de muestra de esputos, líquidos o tejidos obtenidos de los órganos afectados. La otra técnica utilizada, cuando tres tinciones son negativas es el cultivo. El cultivo aumenta la probabilidad de diagnosticar a 80- 90% con las formas pulmonares y hasta 50% en las extrapulmonares, pero tiene la desventaja de demorar el diagnóstico hasta dos meses mientras crece la micobacteria.

Los métodos moleculares como la PCR ofrecen ventajas: es capaz de detectar pocas micobacterias hasta 1 a 10 por muestra y por ende sus resultados son mucho más rápidos, 1 a 2 días constituyendo una alternativa diagnóstica de las pruebas tradicionalmente utilizadas.

En el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular se dispone de la infraestructura apropiada y una prueba de PCR casero IS6110 previamente estandarizado (**Díaz ML y col., 2005**) que detectó un fg de ADN de cultivo de *M.*

tuberculosis y amplificó el fragmento esperado hasta en 500 fg de ADN de muestra clínica de cultivo positivo. Dicha prueba también identificó la TB en 92.3% de muestras líquidas de 13 pacientes con TB establecida y 66.7 % con TB clínica, con especificidad del 95%. Este trabajo se desarrolló con el fin de determinar el desempeño del PCR casero IS6110 para identificar la TB en un mayor número de pacientes y en diferentes muestras clínicas con diferentes formas de la enfermedad. Se analizaron 78 casos de TB y 76 individuos no TB; el PCR fue positivo en 98% de 49 TB pulmonar establecida y 100% de 6 TB extrapulmonar establecida. El ZN fue positivo en 98% y 66.7%. El cultivo positivo en el 80.8 % y 100% respectivamente. En TB clínica PCR fue positivo en 100% de 4 TB pulmonar y 68.4% de 19 TB extrapulmonar. Ninguna de las formas de TB clínica fue positiva para ZN o el cultivo. Todos los individuos sin TB fueron PCR negativos. La sensibilidad del PCR en TB establecida es 98.2%, TB clínica 73.9% y todas las formas 91%. La especificidad fue del 100%. Se evidencia que el PCR contribuye al diagnóstico de TB ya que es mejor que el ZN y cultivo, con una especificidad del 100% y además ahorra tiempo para identificar pacientes con diferentes formas de TB.

INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) el cual fue descubierto por Robert Koch en 1882. Esta bacteria se caracteriza por ser ácido alcohol resistente **(Morales, 2002)**, aerobio estricto, inmóvil, no esporulado, y multiplicación lenta. El tiempo de replicación es 15 – 20 horas.

La TB es un problema de salud pública. El 30% de la población mundial está infectada y se estima que anualmente existen entre 7 a 8 millones de nuevos casos de enfermos y entre 2 a 3 millones de muertes en todo el mundo **(Raviglione, 2003)**. En Colombia, para el 2006, se presentaron 25 casos por cada 100.000 habitantes y en el Cauca, para el 2008, se presentaron 228 casos por cada 100.000 habitantes **(Secretaría departamental de Salud del Cauca 2009)**.

El diagnóstico de la TB se basa en varios criterios denominados: criterio clínico, epidemiológico, radiológico, tuberculínico, histopatológico y microbiológico, los cuales son inespecíficos excepto los métodos microbiológicos como la baciloscopia y el cultivo para micobacterias. La baciloscopia tiene una sensibilidad para el diagnóstico de TB pulmonar que varía entre 22 y 88 %, de acuerdo con el método de tinción y el número de muestras analizadas por paciente. **(Galvez, et al., 2000)**. El cultivo para TB pulmonar tiene una sensibilidad que varía entre el 50 – 81 %. Una de las ventajas de este método es que permite realizar estudios de susceptibilidad antimicrobiana en los aislados clínicos de *M. tuberculosis*. La desventaja es el costo elevado y el tiempo prolongado para obtener el resultado. Otra limitante de los métodos microbiológicos es la pobre sensibilidad para el diagnóstico de TB en niños y en los casos de TB extrapulmonar **(Kato, 2002)**, que son formas con poca cantidad de bacilos.

Una de las innovaciones más revolucionarias de las ciencias básicas y que ha alcanzado una extensa aplicación clínica en años recientes, ha sido la técnica de amplificación directa de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica ha sido usada en el diagnóstico de la TB utilizando *primers* para diversos genes entre ellos el gen 65 kDa, el de 38 kDa, el gen para el Ag 85b, MPB 64, Mtp 40, la secuencia de inserción IS6110 y ARN ribosomal (**Baldeviano, et al., 2007**). La mayoría de los investigadores han elegido la secuencia de inserción IS6110 de ADN de *M. tuberculosis* (**Carcelén, et al., 1981**), dicha secuencia consta de 1,361 pb, se encuentra únicamente en el complejo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) y se repite muchas veces, generalmente entre 5 a 20 veces aunque algunas pocas cepas pueden no tener ni una (**Fomukong, et al., 1994**). El PCR para esta secuencia puede detectar hasta cantidades mínimas de ADN de la micobacteria entre 1 y 10 fg.

La sensibilidad y especificidad en los diferentes reportes de resultados de PCR han sido muy variados entre, 78 % y 90.76 %, y entre 88 % y 97.60% respectivamente (**Park, et al., 2003**), lo que ha generado cierta controversia en la aplicación de esta prueba, generando la necesidad de realizar más estudios para establecer la verdadera contribución del PCR al diagnóstico de TB. Con el presente trabajo se buscó determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba casera disponible en el medio usándola en pacientes del departamento del Cauca en correlación con las pruebas tradicionales (baciloscopia, cultivo, historia clínica) con el fin de recomendar o descartar su utilización en el medio. Otro aspecto tratado en el presente trabajo es la inclusión de muestras de orina, líquido cefalorraquídeo, aspirado gástrico, biopsias, entre otras, con lo cual se pretende valorar la prueba en tuberculosis extrapulmonar.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La TB continúa siendo una de las principales causas de muerte por agente infeccioso único, en adultos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que a nivel mundial, en el año 2006, se presentaron 9,2 millones de casos nuevos de TB, de los cuales 4,1 millones (44%) tenían baciloscopia positiva (forma contagiante de la enfermedad); 0,7 millones (8%) tenían coinfección con el VIH-SIDA; 0,5 millones (5,4%) eran multidrogorresistente (MDR: resistente a Isoniazida y Rifampicina) y 1,7 millones falleció a causa de la TB **(WHO, 2008)**. Los casos reportados en Colombia (2007 para el Sivigila colectivo)= fueron 8.365 casos correspondientes a una tasa de 19 x 100.000 habitantes, y para el departamento del Cauca 2008 fueron 228 casos correspondientes a una tasa de 17.57 x 100.000 habitantes (Secretaría departamental de Salud del Cauca 2009).

El programa para el control de la TB como problema de salud pública en Colombia y en muchos países que siguen los lineamientos de la OMS se basa en la búsqueda y examen de sintomáticos respiratorios (personas con tos y expectoración por más de 2 semanas), para identificar la presencia de micobacterias mediante la tinción de ZN de 3 muestras de esputo; suministrar el tratamiento a los positivos, en forma supervisada lo que se denomina la estrategia DOTS. Esto con el fin de cortar la transmisión y así disminuir la población infectada y la posibilidad de nuevos casos bacilíferos. La identificación de los pacientes tuberculosos; además de los problemas de sensibilidad de la tinción tiene problemas en su aplicabilidad en la práctica cotidiana, pues muchos enfermos no recogen las 3 muestras por dificultades culturales, barreras de acceso, algunas económicas, otras incluso relacionadas con la todavía deficiente implementación de las actividades del programa por parte de las Instituciones Promotoras de Salud y los encargados de la atención de los vinculados y no

afiliados. Toda esta variedad de hechos obstaculizan el diagnóstico y el tratamiento, ya que muchos pacientes se pierden antes de culminar el proceso porque deben pagar transporte, solicitar turnos para consultas, tramites de órdenes de apoyo, etc.,

La baciloscopia es una herramienta útil para el rápido tamizaje y la detección de casos, ya que es un método simple, barato y fácil de realizar, pero su sensibilidad es baja, se requiere aproximadamente 10.000 bacilos/ml de muestra. El cultivo en medio Ogawa- Kudoh (OK) que se usa como diagnóstico confirmatorio, es más sensible que la baciloscopia requiere de 100 a 400 bacilos/ml para ser positivo, pero puede demorar más de tres semanas debido al largo tiempo de replicación de la micobacteria (**Laszlo, 1999**), esto hechos hacen que alrededor del 20% de las TB pulmonares y hasta el 90% de las extrapulmonares sean tratadas sobre bases clínicas.

La TB infantil constituye entre el 1 y el 4% (**Echevarría, 2007**) de los casos de TB, el diagnóstico de certeza es difícil; debido a la baja proporción de aislamiento del bacilo. Los casos paucibacilares, extrapulmonares e infantiles, entre otros; son muy difíciles de detectar mediante la baciloscopia.

Una prueba que por tener mejor sensibilidad estableciera el diagnóstico en una sola muestra, podría mejora la posibilidad de diagnosticar los pacientes enfermos con menos barreras y tramites, detectarlos, más tempranamente cuando tienen menos carga bacilar, y por lo tanto transmitir menos la enfermedad.

Igualmente, una prueba sensible y con buena especificidad puede identificar mejor pacientes con TB extrapulmonar, TB infantil y TB asociada a VIH.

El avance en el campo de la genética molecular ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas basadas en la detección del material genético. Se han ensayado

varios métodos moleculares basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando diversos fragmentos del genoma *M. TB* como el gen 65 kDa, el de 38 kDa, el gen para el Ag 85b, MPB 64, Mtp 40, la secuencia de inserción IS6110 y ARN ribosomal **(Baldeviano, et al., 2007)**, los cuales han mostrado ser más efectivos que los métodos existentes. Numerosos estudios de PCR con estos diferentes fragmentos de *M. tuberculosis* han sido informados pero la sensibilidad y especificidad han sido muy variadas y en muestras paucibacilares no se conoce bien la utilidad. **(Sarmiento, 2003)**

La PCR casera IS6110 puede contribuir a dar solución de los problemas mencionados, ya que esta se presenta como una metodología rápida, económica y de fácil implementación para la identificación de micobacterias **(Devallois et al, 1997; Burgos et al, 2004)**; de gran sensibilidad detectando hasta un fg **(Díaz y col. 2005)** y especificidad, entre 98% y 100% para micobacterias del complejo *M. tuberculosis* **(Piersimoni and Scarparo, 2003)**.

Dos estudios para valorar el desempeño de diferentes laboratorios en el procesamiento de muestras para detectar ADN de micobacterias por PCR cada uno con su propia técnica, muestran sensibilidad entre 53.8 % y 25% y especificidad 78.8 %, 65% **(Bouakline., et al., 2003; Gerda T., et al., 1996)**. Esto se debió a la falta de estandarización en las técnicas de extracción, amplificación, detección, controles de contaminación y los diferentes *primers* usados por cada laboratorio.

Es entonces necesario evaluar la aplicabilidad de una técnica disponible en el medio para la identificación de pacientes con TB de la región; teniendo en cuenta que en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca se ha estandarizado el protocolo para PCR IS6110 que puede detectar *M. tuberculosis* en diferentes tipos de

muestras clínicas demostrando la TB en 92.3% de muestras líquidas de 13 pacientes con TB establecida y 66.7 % con TB clínica, con una especificidad del 95% **(Díaz B., y col 2005)**.

En resumen, el problema de la PCR casera es la gran variabilidad en sensibilidad y especificidad, en comparación con el ZN y el cultivo; de ahí la necesidad de realizar estudios para contribuir a establecer la prueba como una herramienta útil y confiable para el diagnóstico en TB en especial en los casos extrapulmonares.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el desempeño del PCR casero IS6110 para identificar pacientes con TB pulmonar y extrapulmonar.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer las diferencias entre sensibilidad y especificidad del PCR casero IS6110 versus los métodos tradicionales de diagnóstico de TB como el ZN y el cultivo.
- Determinar y comparar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del PCR casero IS6110 con la de ZN y cultivo para identificar TB pulmonar y extrapulmonar.
- Comparar los resultados del PCR casero IS6110 en pacientes con TB clínica y establecida.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El término TB describe una amplia gama de enfermedades clínicas causadas por *M. tuberculosis* (o menos a menudo *M. bovis*). Es la causa de muerte debido a un único agente infeccioso más frecuente en todo el mundo. En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la TB como una emergencia global de salud pública.

3.1. GENERALIDADES

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*; son bacilos inmóviles, no esporulados, aerobios característicamente ácido-alcohol resistente, el crecimiento es lento, el tiempo de generación es de 15 a 20 horas, comparado con mucho menos de 1 hora para los patógenos bacterianos más frecuentes. El crecimiento visible tarda de 3 a 6 semanas en medios sólidos. El microorganismo tiende a crecer en grupos paralelos, y produce la característica colonia formando cordones sinuosos (**Goodfellow, et ál, 1982**).

La descripción de las micobacterias como ácido-alcohol resistentes implica que tras la tinción resisten la decoloración con alcohol acidificado, así como con ácidos minerales fuertes. Otras bacterias pertenecientes a los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* pueden resistir parcialmente la decoloración con ácidos débiles, especialmente cuando han crecido en medios ricos en lípidos, pero son fácilmente decoloradas con alcohol. El grado de ácido-alcohol resistencia varía con la técnica y las condiciones de cultivo (**Harrington, 1966**), pero todas las micobacterias son ácido-alcohol resistentes al menos en algún estadio de su crecimiento. Esta propiedad

se debe al elevado contenido en lípidos en su pared celular; entre los que se incluyen los característicos ácidos micólicos, solubles en cloroformo, de 60 a 90 átomos de carbono en cadenas ramificadas y con un punto de fusión muy alto **(Goodfellow, et ál, 1982)**. Los componentes de la pared celular de las micobacterias están implicados en la respuesta del hospedador al *M. tuberculosis* y a otras micobacterias **(Goren, et al, 1979)**; Los seres humanos son el único reservorio para *M. tuberculosis*.

3.2 EPIDEMIOLOGÍA

M. tuberculosis infecta un tercio de la población mundial. La TB era hasta recientemente la causa principal de muerte en todo el mundo por cualquier agente infeccioso aislado **(WHO, 1997)** y es actualmente la segunda causa después del VIH. En el siglo pasado aún antes de la introducción de la quimioterapia se observó un descenso en la morbimortalidad del 4% al 6% anual en los países desarrollados, el cual se duplicó con el inicio del tratamiento farmacológico. Sin embargo, en los inicios de los 90s, La TB reemergió con la epidemia del SIDA, el deterioro de las condiciones socio-económicas de la población, de la inversión en salud por parte de los gobiernos y la aparición de multirresistencia **(OMS, 1993)** que afecta a todas las regiones del mundo, en especial aquellas donde la estrategia de la DOTS (Directly Observed Treatment Short course) no se ha implementado adecuadamente o donde los tratamientos se usan de manera irracional **(García, et al., 2004)**. Los estimativos de la OMS indican que anualmente ocurren cerca de medio millón de casos de TB-MDR.

Del 30% de infectados el 10% desarrollan enfermedad activa y el 50% de las personas enfermas forman cavidades pulmonares (es decir, se tornan contagiosas). Por lo tanto, cada caso cavitario infecta alrededor de 20 personas **(Styblo, 1980)**.

Con el fin de detener el avance de la enfermedad, en el 2000 se conformó la Alianza alto a la TB, que busca promover y coordinar los esfuerzos mundiales en torno a la investigación, el financiamiento y la formulación de políticas de lucha contra la TB, para lograr los objetivos y metas de la lucha antituberculosa, los cuales fueron incluidos en los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM).

En el 2006, la Alianza alto a la TB presentó el “Plan mundial para detener la TB, 2006-2015”. La Alianza ha enfatizado que las nuevas tecnologías pueden revolucionar la lucha contra la TB, pero que hoy: “puede darse un gran giro a la evolución de la enfermedad en gran parte del mundo si logramos identificar y curar rápidamente a las personas que padecen la enfermedad activa” (**Alianza Alto a la TB y OMS. 2006**). Éste es el enfoque de la estrategia DOTS que continúa siendo el eje central de la lucha antituberculosa, la cual debe expandirse y adaptarse para dar respuesta adecuada a la coinfección TB/VIH y la TB-MDR mediante la vigilancia rutinaria, el manejo integral de casos con estas situaciones, y políticas claras de colaboración entre programas que vinculen a la comunidad y organizaciones científicas y cívicas, entre otros.

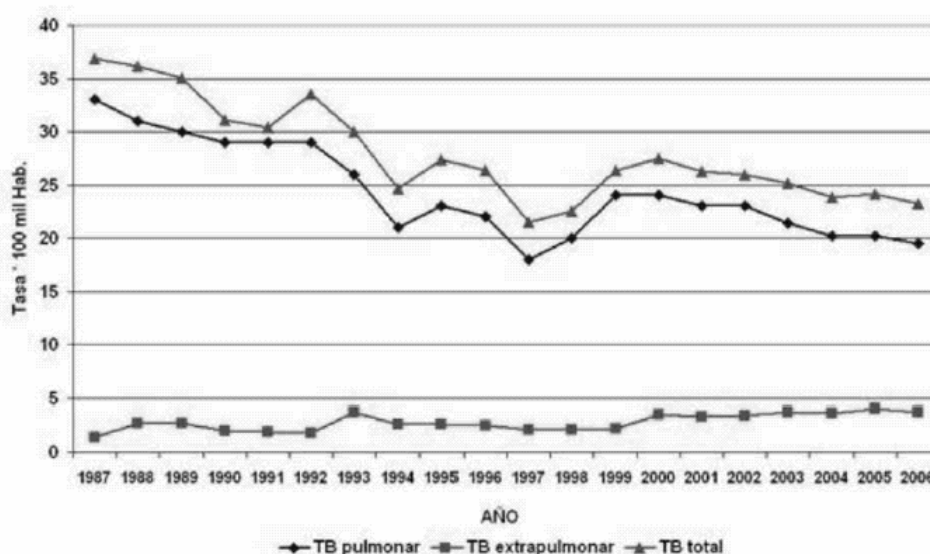
A pesar de los muchos esfuerzos de los organismos internacionales, la TB sigue siendo un problema de salud pública. En el 2006 el número de casos nuevos de TB notificados a la OMS, fue de 9,2 millones (139 por 100.000 habitantes) y, a pesar de que existen medicamentos para tratar efectivamente la enfermedad, la cifra estimada de muertes correspondió a 1,7 millones (**who, 2008**)

3.3 COMPORTAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EN COLOMBIA 2007

En los últimos siete años la tasa de incidencia de TB ha venido presentando un lento y sostenido descenso, aproximadamente, de 0,6 casos por 100.000 habitantes (Figura 1). En el 2006 se reportaron al Programa Nacional de TB

10.696 casos nuevos de TB para una tasa de incidencia de 24 casos por 100.000 habitantes. Con respecto al tipo de TB, es importante el aumento de la TB extrapulmonar en los últimos años la cual ha pasado de 2,1 casos por 100.000 habitantes en 1997 a 3,3 en el 2001 y a 3,7 por 100.000 en el 2006 (**Castilblanco y otros, 2008**).

Figura 1. Tasa de incidencia de tuberculosis por 100.000 habitantes, Colombia, 1987-2006.



Fuente: MPS/INS, Programa Nacional de Tuberculosis

La proporción de casos de TB en niños (menores de 15 años) con respecto al total se ha mantenido estable con tendencia al aumento; en el 2006, el 7,5% (805) de los casos nuevos de TB reportados correspondía a menores de 15 años. El porcentaje de casos de TB con baciloscopia positiva en menores de 15 años con respecto al total, ha pasado de 2,9% en 1996 a 5,6% en el 2006, lo que evidencia un claro aumento en la incidencia de la forma bacilífera en niños. Sin embargo, las mayores tasas de incidencia de TB se encuentran en los mayores de 44 años.

La tasa de incidencia de TB en Colombia, en el 2007, según Sivigila (colectivo) fue 19 x 100.000 habitantes; de los 8.365 casos de TB reportados al Sivigila

(colectivo), 589 (7%) corresponden a niños (menores de 15 años) lo cual arroja una tasa de incidencia en menores de 15 años de 4,5 casos por cada 100.000 menores de 15 años. La coinfección con VIH se reportó en 8.5% siendo los casos extrapulmonares más frecuentes y para el departamento del Cauca, en el 2008, la incidencia de TB fue 228 casos correspondientes a una tasa de 17.57 x 100.000 habitantes **(Secretaría departamental de Salud del Cauca 2009)**.

No obstante se conoce que el cambio en el sistema de salud y seguridad social, Colombia ha tenido un reporte negativo en el control de la TB, hay una baja búsqueda y captación de casos de TB para lo cual el descenso no es real y subestima las tasas de TB

Finalmente, la elevada tasa de incidencia de TB en algunas regiones del país, la baja captación de sintomáticos respiratorios en la mayor parte del mismo, las debilidades en el sistema de información y, principalmente, la falta de directrices oficiales que permitieran el trabajo conjunto para abordar este problema a la luz de los objetivos de desarrollo del milenio y el plan mundial “Alto a la tuberculosis”, incentivaron la elaboración del plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis, 2006-2015” **(Min. Protección social, 2006)**.

3.4 TRANSMISIÓN

La TB es transmitida de persona a persona principalmente por vía respiratoria, a través de microgotas. Los bacilos tuberculosos (en número de 1 a 3) forman los núcleos de estas microgotas, lo suficientemente pequeñas (1-5 micras de diámetro) como para evaporarse, y permanecer suspendidas en el aire varias horas; Las partículas de mayor tamaño, aunque tengan mayor número de bacilos, son menos contagiosas, pues caen por gravedad, o en el caso de ser inhaladas, son eliminadas por el sistema mucociliar y la tos **(Bates and Stead, 1993)**. La micobacteria sale al aire en las secreciones respiratorias que son expulsadas del

paciente en el momento que tose, habla, estornuda y se ríe, y los individuos que comparten el aire inhalan la bacteria alcanzando de esta manera los alvéolos pulmonares. En el periodo de incubación, que puede variar desde el momento de la infección hasta 90 días, la bacteria crece lentamente en los macrófagos, pudiendo diseminarse a otras partes del cuerpo del hospedero. La frecuencia de infección en expuestos, en promedio es 30% y los factores de riesgo de infección de un sujeto depende de la cantidad de enfermos bacilíferos en la población y de factores del individuo (estado inmunitario, edad y experiencia histórica de su grupo poblacional con el bacilo) **(Starke and Correa, 1995)**. En la mayoría de casos, esta enfermedad es controlada por la inmunidad celular, y solo un 10% desarrollará la enfermedad activa a lo largo de su vida **(Parrish, et al., 1998)**. Pero si el infectado tiene coinfección con VIH, la probabilidad de enfermarse es del 10% por año **(Corbett, 1996)**. El 90% de los infectados, tienen infección latente, son PPD positivos, y no desarrollan la enfermedad **(Miller, et al., 1996)**.

3.5 ASOCIACIÓN ENTRE VIH Y TB

La evolución de la TB en individuos infectados con el VIH es completamente diferente a la del resto de la población **(Barnes et al., 1991)**. El reporte de ONUSIDA del 2001 estimaba que en todo el mundo 42 millones de personas están infectadas con VIH. Cerca de 15 millones de ellas estaban co-infectadas con *M. tuberculosis*. Más de las dos terceras partes de esta co-infección se encuentra en el Africa Sub-Sahariana, con la mayoría del tercio restante en la India. En el Africa Sub-Sahariana cerca del 60% de pacientes con TB están co-infectados con VIH y anualmente existen cerca de 200,000 muertes por TB atribuibles al VIH **(McShane, 2005)**. La sinergia entre ambos es más mortífera de lo que se suponía, ya que un individuo infectado con TB que se infecte con el VIH probablemente desarrolle la enfermedad, generalmente de curso lento, pero individuos infectados con VIH que entran en contacto con los bacilos tuberculosos sufren una enfermedad aguda, con diseminación miliar, falleciendo en menos de 6 meses

(Fox, 1992). En población infectada por VIH el riesgo de desarrollar la enfermedad para individuos positivos a la prueba de la tuberculina es el 8% anual (DiPerri et al., 1989) y presentan más comúnmente TB extrapulmonar coexistiendo con la enfermedad pulmonar. Un estudio realizado en 20 ciudades de Estados Unidos reveló que una media de 10,4% (intervalo de 0 a 61%) de los pacientes con tuberculosis eran VIH-seropositivos (Elíner et al., 1993). En estos pacientes el diagnóstico es a menudo difícil y se logra tardíamente porque su reactividad frente al PPD puede verse afectada debido a la anergia, y el diagnóstico radiológico puede mostrar solamente unos patrones de infiltración difusos (Kramer et al., 1990), fácilmente confundibles con neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (Elíner, et al., 1993). El diagnóstico de la enfermedad tuberculosa en pacientes VIH positivos es más difícil debido a que la baciloscopia y el cultivo son menos frecuentemente positivos debido a que expectoran menos y expulsan menos bacilos por la incapacidad para formar granulomas con caseificación y adicionalmente otras enfermedades pueden simular los síntomas o coexistir.

3.6 FORMAS DE PRESENTACIÓN DE LA TUBERCULOSIS

De acuerdo a los órganos afectados se puede clasificar como pulmonar o extrapulmonar.

3.6.1 Tuberculosis Pulmonar. TB primaria. El foco inicial de TB pulmonar es más frecuentemente en las zonas pulmonares intermedias, pero se puede desarrollar en cualquier sitio. En el momento de la conversión tuberculínica, se puede presentar fiebre y debilidad. Las manifestaciones clínicas de la infección inicial dependen de la edad del paciente puede ser asintomática o puede generar linfadenopatías regionales extensas que comprimen los bronquios centrales y producen atelectasias de un segmento o un lóbulo, o pueden romperse en un bronquio, sembrando distalmente la infección, y

produciendo neumonía con tos, muy rara vez puede suceder cavitación. Los niños entre los 4 y 5 años son relativamente resistentes a la micobacteria y la infección permanece en esta edad, por lo tanto no es progresiva a corto plazo, lo cual la quimioterapia no parece adicionar efecto beneficioso en esta edad (**Dalh, 1952**).

La TB primaria, después de la infancia, puede ser asintomática, puede producir un complejo primario típico o puede conducir a una TB Pulmonar crónica típica. Cualquier infiltrado neumónico, sobre todo si es redondeado y esta asociado a agrandamiento ganglionar, hiliar o mediastinal, o se encuentra en una localización inusual, sobre todo por delante del plano traqueal, es factible que represente una infección tuberculosa primaria. Estas lesiones pueden sufrir caseificación, licuefacción y propagación broncógena al igual que con la TB pulmonar crónica.

La TB pulmonar posprimaria (de tipo adulto) es asimétrica y se caracteriza por caseificación, formación de cavidades y fibrosis. Comienza como un parche de neumonía en la cara posterior subapical de un lóbulo superior, inmediatamente por debajo de la clavícula o la primera costilla. También puede ser en el vértice del lóbulo inferior, la caseificación tiende a licuarse y drenar en el árbol bronquial, lo que propaga el contenido bacilar por la tos. El colapso de la cavidad es prevenido por la cápsula fibrosa y la falta de elasticidad del pulmón circundante. Por razones poco claras, la cavidad pulmonar favorece la multiplicación bacilar hasta títulos enormes, 5 a 6 logs mayores que en las lesiones no cavitarias (**Cannetti, 1965**). La naturaleza progresiva de la TB pulmonar en el huésped sensibilizado se debe a: 1) La tendencia de los focos caseosos apicales a licuarse, 2) las concentraciones enormes de microorganismos en las cavidades pulmonares resultantes y 3) la propagación de este material rico en bacilos a través del árbol

bronquial. La progresión desde un infiltrado mínimo hasta una enfermedad cavitaria muy avanzada puede producirse en algunos meses.

La tos vaporiza las secreciones de las cavidades infecciosas que pueden distribuirse con amplitud en todo pulmón (propagación broncógena). Por último se desarrollan focos nuevos que por su parte, pueden sufrir caseificación, fibrosis y curación o esfacelo, lo que conduce a nuevas cavidades. Se puede presentar ulceración endobronquial y laringitis tuberculosa ulcerativa y afección de cualquier sitio de la vía respiratoria superior incluyendo el oído. En personas de edad avanzada se puede producir una neumonía en los lóbulos inferiores o en el lóbulo medio similar a la infección primaria pero sin adenopatías (**Otead, 1981**). La linfadenitis y la calcificación regionales no son características de la TB pulmonar crónica en los adultos.

Síntomas: La TB pulmonar temprana es asintomática y por lo general se descubre por casualidad en una radiografía de tórax. Sin embargo a medida que crece la población bacilar, puede producirse síntomas constitucionales inespecíficos, como anorexia, fatiga, pérdida de peso, sensaciones de escalofríos, fiebre vespertina, sudores nocturnos. Estas últimas manifestaciones de inicio gradual sorprendentemente bien toleradas y a menudo no las reconoce ni siquiera el paciente. Los síntomas locales también indican una enfermedad avanzada. Por lo general se presenta tos productiva. La tos con expectoración de secreciones cavitaria clara suelen ser leves y bien tolerada, pero puede volverse molesta cuando la afectación bronquial es extensa.

El esputo mucopurulento es inespecífico, y tanto la tos como el esputo pueden ser ignorados por los pacientes con bronquitis crónica. Por lo general, la hemoptisis por esfacelamiento caseoso o erosión endobronquial es menor, pero indica una enfermedad avanzada. La hemoptisis masiva súbita por erosión de una arteria

pulmonar por una cavidad que avanza (aneurisma de Rasmusen) era un acontecimiento terminal ocasional en la era previa a los fármacos, pero en la actualidad se observa rara vez. En la enfermedad inactiva, la hemoptisis brusca puede deberse a sobreinfección por *Aspergillus* de las cavidades residuales (aspergiloma). Por lo general, el dolor torácico se debe a la extensión de la inflamación a la pleura parietal. La afectación pleural adyacente a una cavidad establecida tiende a producir sínfisis pleural visceral – parietal sin derrame (pleuresía seca). La pleuresía serofibrinosa con derrame a menudo es un episodio posprimario temprano, pero puede complicar la TB pulmonar crónica. Pocas veces, el dolor torácico conduce al descubrimiento del empiema tuberculoso. Algunos pacientes no buscan ayuda hasta que la enfermedad se presenta en los tejidos bañados en secreciones pulmonares muy infecciosas, como las úlceras faríngeas dolorosas; úlceras indolentes que no cicatrizan de boca y lengua; disfonía y disfagia que se deben a la afectación laríngea; otitis media tuberculosa; síntomas gastrointestinales que se deben a ulceración, perforación o la formación de masas entéricas; o dolor anal por un absceso perirrectal tuberculoso y formación de fístulas. La TB de los lóbulos inferiores por perforación de los ganglios linfáticos bronquiales se puede asociar con litoptisis (derrame de cálculos) y produce síntomas característicos de enfermedad endobronquial grave con tos intensa y a menudo hemoptisis.

3.6.2 Tuberculosis Extrapulmonar. La TB extrapulmonar puede dividirse en tres grupos sobre la base de la patogenia. El primero comprende focos mucosos superficiales debido a la propagación de secreciones pulmonares infecciosas a través de los tractos respiratorio y gastrointestinal. En otra época, estas lesiones eran complicaciones casi inevitables de la enfermedad pulmonar cavitaria extensa, pero en la actualidad son raras. El

segundo grupo comprende focos establecidos por propagación contigua, como el proveniente de un foco subpleural en el espacio pleural. El tercer grupo comprende focos establecidos por diseminación linfohemática, ya sea en el momento de la infección primaria o, con menos frecuencia, de focos pulmonares o extrapulmonares crónicos establecidos. La progresión de los focos establecidos por diseminación linfohemática implica cierto grado de compromiso de la inmunidad.

3.6.2.1 TB miliar. El término TB miliar, utilizado en principio para describir la semejanza de las lesiones anatomopatológicas con semillas de mijo, en el presente describe cualquier TB hemática diseminada progresiva. La TB miliar puede presentarse de forma subaguda o crónica dependiendo si afecta a niños, adultos jóvenes o individuos de edad avanzada, puede infectarse cualquier órgano incluyendo derrame pleural, peritonitis, meningitis, ganglios linfáticos, hígado, bazo, escroto y piel. En la actualidad es más frecuente en la edad avanzada y en muchos casos el diagnóstico es difícil, se requiere examinar diversas muestras, incluyendo biopsias de hígado y cultivos al jugo gástrico, orinas y lavado bronco alveolar (**Rossmann and MacGregor, 1994**).

3.6.2.2 TB del sistema nervioso central. Por lo general, la Meningitis TB es causado por la ruptura de un tubérculo subependimario en el espacio subaracnoideo. La meningitis que complica la enfermedad miliar. En la infancia, la meningitis es un episodio posprimario temprano, y el 75% de estas personas tiene en forma simultánea un complejo primario activo, derrame pleural o TB miliar. Los focos subependimarios se pueden mantener quiescentes de manera indefinida antes de su ruptura. Esto puede seguir al traumatismo de cráneo o asociarse con depresión general de la inmunidad del huésped como resultado de alcoholismo u otros factores.

La meningitis espinal tuberculosa es una rara manifestación de la TB y puede tener o no afección intracraneana. Un tuberculoma intramedular o una masa granulomatosa extradural puede producir síntomas sin afección meníngea. La compresión de las raíces nerviosas o de la médula produce dolor, debilidad del esfínter vesical o rectal, hipoestesia, anestesia, parestesias en la distribución de una raíz nerviosa o parálisis. El bloqueo subaracnoideo puede producir concentraciones de proteínas en LCR en extremo altas, con células o sin ellas.

3.6.2.3 Pericarditis tuberculosa. Es causada más a menudo por la extensión desde un foco contiguo de infección, por lo general mediastínico o de los ganglio hiliares, pero también desde el pulmón, la columna vertebral o el esternón. Puede ocurrir durante la TB miliar. Se manifiesta con edemas y dificultad respiratoria, pueda haber fiebre y sudoración nocturna (**Taelmaan, et al., 1990**).

3.6.2.4 TB Osteoarticular. El Mal de Pott (espondilitis tuberculosa), corresponde a la tercera parte de la TB osteoarticular. El primer foco se inicia en el cuerpo vertebral y se encuentra en el ángulo anterosuperior o anteroinferior, se propaga al disco intervertebral y las vértebras adyacentes, se desarrolla un cuadro radiológico de acúñamiento anterior de dos cuerpos vertebrales adyacentes con destrucción

del disco interpuesto y el hallazgo físico de una prominencia o giba de la columna dolorosa a la palpación. Se afecta más a menudo la columna torácica inferior, en segundo lugar la lumbar, y en menor grado la columna cervical y sacra.

Los primeros síntomas pueden ser simplemente dolor o rigidez dorsales con una radiografía al inicio normal, lo cual demora el diagnóstico hasta que aparecen signos de enfermedad avanzada como parálisis, deformidad o formación de fístulas. Los bacilos son escasos, y el frotis y el cultivo de pus o tejido son positivos en el 50% de los casos. Los estudios histológicos ponen en evidencia granulomas con caseificación o sin ella, en el 75% de los casos.

La TB osteoarticular periférica puede presentar una monoartritis crónica y lentamente progresiva en el 90% de los casos **(Davidson, et al., 1970)**, e infrecuentemente en población de mayor edad, como afección articular múltiple **(Lizares, et al., 1991)**.

3.6.2.5 TB genitourinaria. Puede comprometer el riñón con focos corticales asintomáticos durante todas las formas de TB. Un estudio de necropsias de TB pulmonar mostró focos renales no sospechados en el 73% de los casos, por lo general bilaterales; el 25% de los casos miliares tiene urocultivo positivo **(Bentz, et al., 1975)**.

La mayoría de los pacientes con TB genitourinaria evidencian enfermedad extragenitourinaria simultánea, por lo general pulmonar y con más frecuencia inactiva. En los huéspedes normales, el intervalo entre la infección y la enfermedad renal activa suele ser de años y a veces de décadas. Predominan los síntomas locales, y la destrucción tisular avanzada puede presentarse mucho antes de que se establezca el diagnóstico. Se trata en mayor medida de una enfermedad de los adultos de edad media.

El 80% de las TB genitales masculinas se asocia con enfermedad renal coexistente, y la mayoría de las TB renales avanzadas se asocia con algún foco de infección genital masculina (**Gorse, et al., 1985**) puede afectar la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y los testículos, en ese orden. El hallazgo clínico habitual es una masa escrotal que puede ser dolorosa a la palpación o asociarse con una fístula que drena. Los focos genitales no asociados con enfermedad renal se pueden establecer por propagación linfohemática y suelen presentarse como una masa testicular o escrotal dolorosa. El diagnóstico es difícil y por lo general se establece mediante cirugía.

La TB genital femenina comienza con un foco hemático en el endosálpax, desde el cual se puede propagar hasta el endometrio (50%), los ovarios (30%), el cuello uterino (10%), y la vagina (1%) (**Carter, 1990**).

En el cuello uterino, una masa ulcerada granulomatosa puede ser semejante a un carcinoma. Los síntomas frecuentes son infertilidad o síntomas locales, como trastorno menstrual o dolor abdominal. Aunque los cultivos de la sangre menstrual o los raspados endometriales pueden ser positivos, el diagnóstico se suele efectuar por el examen histopatológico del tejido afectado.

TB gastrointestinal: Puede afectar cualquier sitio del tubo digestivo desde la boca hasta el ano, produciendo úlceras o cavidades que no cierran. El sitio más frecuentemente afectado es el ileón terminal y el ciego produce obstrucción y bacteremia, fístulas, abscesos, perforaciones, hemorragias y mala absorción.

La TB pancreática se puede manifestar como un absceso o una TB más que afecta los ganglios locales y se asemeja a un carcinoma. Las vías biliares pueden estar obstruidas por ganglios tuberculosos o por colangitis ascendente

tuberculosa. La TB es una causa frecuente de hepatitis granulomatosa. Por lo general, es asintomática, pero se puede asociar con nivel de fosfatasa alcalina que es desproporcionada a los niveles de bilirrubina, con niveles normales de transaminasas. Muy pocas veces la hepatitis granulomatosa tuberculosa produce ictericia sin indicios de tuberculosis extrahepática. Esta se denomina TB primaria del hígado. La TB hepática focal se describe como abscesos tuberculosos únicos o múltiples. Estos suelen aparecer con mayor frecuencia con grupos raciales con poca inmunidad natural a la tuberculosis y en los niños **(Kielhofner, et al., 1991)**

3.6.2.6 Peritonitis tuberculosa. Es resultado de la propagación de la enfermedad tuberculosa adyacente como un gangliolinfático abdominal, un foco intestinal o de la trompa de Falopio, o durante la TB miliar. En un resumen de 11 series se presentaron indicios de TB pleuropulmonar asociada en el 25% al 83% de los casos y la prueba de tuberculina fue positiva en el 30% al 100% de los casos **(Bastani, et al., 1985)**. El derrame pleural es el hallazgo asociado mas frecuente, pero a menudo se presentan indicios de tuberculosis en otros sitios.

El líquido peritoneal es exudativo y por lo general contiene 500 a 2000 células; en los casos típicos predominan los linfocitos aunque en algunos casos los leucocitos polimorfonucleares son abundantes al inicio del proceso. La tinción para BAAR del líquido peritoneal rara vez es positiva, y el cultivo solo es positivo en el 25% de los casos. Se publicó que una determinación de la actividad de adenosina desaminasa en el líquido ascítico tiene un alto grado de sensibilidad (86%) y de especificidad (100%) **(Fernández, et al., 1991)**. El análisis del líquido peritoneal mediante PCR también arroja un diagnóstico específico, sin embargo, en ausencia de otros focos de TB, a menudo se debe obtener tejido peritoneal para establecer el diagnóstico. El examen histológico de piezas de biopsia peritoneal obtenidas mediante una aguja de Cope fue positivo en 65% de los casos, y mediante peritoneoscopia en el 85%, en una serie **(Singh et al., 1969)**. Sin embargo se

registraron hemorragias fatales tanto después de la biopsia con aguja de Cope como de la peritoneoscopia (**Bastani et al., 1985**).

3.6.2.7 Linfadenitis tuberculosa (escrófula). La Linfadenitis es la forma más frecuente de TB extrapulmonar. En la personas VIH negativas, suele ser unilateral y de localización cervical (**Haas, 1998**). Se observa más a menudo en mujeres adultas jóvenes de minorías raciales, aunque puede afectar cualquier edad o raza. La linfadenopatía por fuera del área cervical y supraclavicular indica una TB más grave, en general con síntomas sistémicos. El resultado de la prueba tuberculínica casi siempre es positivo. La aspiración con aguja fina muestra indicios citológicos de granulomas, pero los frotis o cultivos suelen ser negativos (**Dandapat, et al., 1990**). A menudo se necesita una biopsia con cultivo para el diagnóstico, porque los ganglios con un aspecto histológico inespecífico fueron positivos para *M. tuberculosis* en cultivo, y el material con características histológicas típicas se puede deber a otras micobacterias u hongos.

El cuadro clínico de todas las infecciones cutáneas por micobacterias, que incluye la TB, es muy variable, y toda lesión cutánea inexplicable, sobre todo si tiene componentes nodulares y ulcerosos, se puede deber a TB, sobre todo en los pacientes con SIDA; también la TB cutánea se puede presentar como eritema nodoso, en el cual se ha detectado ADN de *M. tuberculosis* mediante PCR (**Yen, et al., 1997**). El eritema nodoso se ha atribuido a TB primaria, aunque no se han podido cultivar los microorganismos de las lesiones.

3.6.2.8 Otras formas de TB. La laringitis tuberculosa es una forma rara en la actualidad, más del 50% de los casos de TB se deben a la siembra hemática. Estos casos aún son muy contagiosos. Las lesiones varían desde eritema hasta ulceración y masas exofíticas que se asemejan a un carcinoma (**Lindell, et al., 1977**). Los síntomas son tos, sibilancias, hemoptisis, disfagia, odinofagia y otalgia.

La otitis tuberculosa también es rara y con frecuencia recibe un diagnóstico erróneo. El 50% de los casos no tiene otros indicios de TB actual o pasada. El cuadro clínico clásico es la otorrea indolora con numerosas perforaciones timpánicas, tejido de granulación exuberante, pérdida auditiva grave temprana y necrosis del hueso mastoideo.

3.7 INFECCION VIH (VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA) Y TB

El VIH es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad tuberculosa. Los pacientes con VIH tienen el riesgo de enfermarse de TB en un 10% cada año, versus 10% durante toda la vida, en individuos negativos para el VIH. La infección del VIH modifica la presentación de la TB.

En los pacientes con SIDA, la TB tiene una localización en los campos pulmonares medios o inferiores, no presentan cavitación, y se manifiesta más como formas de enfermedad extrapulmonar. Así, antes de 1985, la TB pulmonar disminuyó cada año, mientras que el número de casos extrapulmonares se mantuvo estable en alrededor de 4.000. Posteriormente la proporción de casos extrapulmonares comenzó a incrementarse. En 1991, en Estados Unidos el 21% de los casos extrapulmonares se asociaron con el SIDA (**Reider, et al., 1990; Shafer, et al., 1991**). La enfermedad pulmonar y extrapulmonar concomitante es muy común en estos pacientes, la diseminación de la enfermedad es alta, 38%. Cuando se

presenta pleuritis tuberculosa a menudo es bilateral y forma parte de un proceso diseminado. La linfadenopatía visceral, tanto mediastínica como abdominal, es frecuente, y un TAC con contraste que muestra ganglios con hipodensidad central sugiere el diagnóstico. También se describieron abscesos de Hígado, páncreas, próstata, bazo, tórax, pared abdominal y otros tejidos blandos.

3.8 TUBERCULOSIS INFANTIL

La OMS estima que anualmente 8 millones de personas enferman de tuberculosis y, de esa cifra, aproximadamente 1.300.000 corresponden a menores de 15 años, y cerca de medio millón de menores mueren por la enfermedad. Colombia, como la mayoría de los países, ha presentado un descenso paulatino de la incidencia y mortalidad de la TB en esas edades, sin embargo, con centenares de niños enfermos anualmente sigue siendo una prioridad su detección y cura.

El riesgo que el niño desarrolle TB después de la primoinfección está relacionado con la edad del menor. Se conoce que 70% de los niños con TB son menores de cinco años, y a esa edad el riesgo de TB hematogena y meníngea está aumentado (**Starke y Jacobs, 1992**) por tanto, la prontitud del tratamiento está en relación directa con el diagnóstico temprano.

Es conocido que la TB del niño difiere de la del adulto en sus aspectos epidemiológicos, su presentación clínica, radiológica, bacteriológica y en ciertos aspectos del tratamiento. En menores de seis años, casi siempre la fuente de contagio es un adulto y con frecuencia es un miembro del entorno familiar, por ello, desde el punto epidemiológico, la búsqueda y estudio de esa fuente infecciosa es de suma importancia para el tratamiento de la TB en el niño.

La presentación clínica refleja la rápida progresión en el niño del estado de infección a enfermedad activa, con formas agudas de TB hematogena y meníngeas, febriles con postración del estado general; de difícil diagnóstico si no se piensa en la enfermedad. Los signos pueden ser la pérdida o no incremento en el peso, tos, fiebre y diaforesis, y con formas extrapulmonares del tipo de linfadenopatía y derrame pleural que en mayores de siete años adquiere la presentación clínica del adulto.

La radiología del tórax, como en la TB del adulto, es muy sensible pero poco específica, mostrando cuadros variables que van desde adenopatías mediastinales solitarias o en unión de infiltraciones parenquimatosas, formando el conocido complejo de Ghon, hasta infiltraciones miliares, con formación de cavernas ocasionalmente y de observación más común en mayores de siete años. El derrame pleural tuberculoso es casi siempre unilateral.

La tuberculina positiva en un menor de edad contribuye al diagnóstico en un niño sintomático, sin embargo en Colombia el valor de ella puede verse afectado debido a la vacunación con BCG la cual puede darse una interpretación errónea del PPD. La recomendación de la guía Nacional para esa situación específica, es que cuando haya duda del valor de la PPD, es mejor asignar su positividad a una infección reciente y no a la vacunación con BCG.

El estudio bacteriológico, *gold standard* del diagnóstico de la TB activa, es difícil de obtener en un niño incapaz de expulsar sus secreciones bronquiales, casi siempre deglutidas, e indica la necesidad de buscar el bacilo en el contenido gástrico, siendo necesario hospitalizarlo para practicar el lavado gástrico, así: se introduce la noche anterior, una sonda nasogástrica, a las 5 am sin despertar al niño, se aspira el contenido gástrico, el cual se deposita en un frasco estéril con fosfato trisódico al 10%, en proporción de 2 ml por 10 ml de muestra. Se pasa 50

ml de agua destilada estéril, y se aspira nuevamente y coloca en el mismo envase el cual se envía rápidamente al laboratorio para baciloscopia y cultivo. Esa maniobra se efectúa durante tres días consecutivos. Cerca de 5% en el frotis y 40% en el cultivo del aspirado, son positivos **(Abadco and Sterner, 1992)**.

En la mayoría de los casos, el tratamiento de la TB en el niño será sin confirmación bacteriológica, y sus controles estarán enfocados a la mejoría clínica y radiológica. En países industrializados, podrán apoyarse para el diagnóstico en otras pruebas, como la PCR en muestras clínicas, con sensibilidad variable pero con especificidad cercana al 100%, haciendo la salvedad que, debido a su alto poder detecta hasta una sola micobacteria en la muestra, es difícil su interpretación en caso de primoinfección. La mejor manera de prevenir la TB en el niño es el diagnóstico y tratamiento temprano de la TB en el adulto. La TB congénita es rara, pero a menudo mortal. La infección puede ocurrir en forma transplacentaria por vía hematológica o por ingestión de líquido amniótico infectado durante el parto, y la enfermedad rara vez es sospechada, a menos que la madre sea una tuberculosa conocida **(Calderón y col. 2005)**.

4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la TB se confirma visualizando y/o aislando e identificando el agente etiológico; para ello se utilizan las siguientes metodologías:

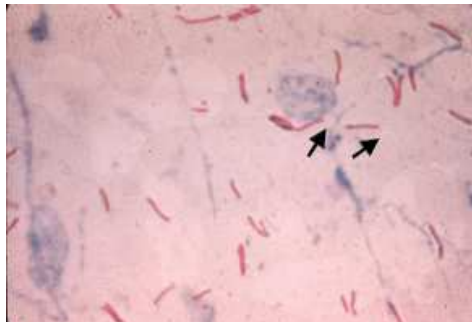
4.1 Criterio Microbiológico

4.1.1 Baciloscopia. Consiste en la observación microscópica de una muestra (esputo, líquidos estériles o tejidos entre otros) teñida con colorantes específicos para micobacterias. Es una técnica rápida, de bajo costo y realización. Existen diferentes coloraciones:

4.1.1.1 Ziehl-Neelsen (ZN). La Prueba de Ziehl Neelsen o tinción para microorganismos ácido alcohol resistentes fue descrita por dos doctores alemanes: Franz Ziehl (1859-1929) y Friedriech Neelsen (1854-1894). La tinción utiliza como colorante fucsina fenicada calentada, y luego se decolora con ácido-alcohol y se tiñe el fondo con azul de metileno, para tener el contraste y poder evidenciar la presencia de BAAR de color rojo (Figura 2) **(SDS, Honduras, 1993)**. La lectura de cada muestra requiere 10-15 minutos, además este procedimiento tiene importancia epidemiológica, ya que detecta a los pacientes bacilíferos, principal fuente de transmisión de la infección **(Cocoyoa y otros, 1988)**. Varios estudios reportan una sensibilidad que varía entre el 40 - 75% **(Warren, et al., 2000)**. Existen estrategias para aumentar la sensibilidad como recolectar entre 5 – 10 mL de esputo, y examinan tres muestras como mínimo; teniendo en cuenta que la segunda baciloscopia capta de un 7 a un 13% mas de pacientes, la tercera alrededor de 4% mas de pacientes con TB **(Mandell, et al., 2000; Warren, et al., 2000; Mase, et al., 2006)**.

El ZN tiene menor sensibilidad que el cultivo, ya que para obtener un resultado positivo requiere que la muestra contenga, como mínimo, 5.000-10.000 bacilos/mL, lo cual la hace aún menos sensible en pediatría, en TB extrapulmonar y en el SIDA en donde la enfermedad es habitualmente paucibacilar (pocos bacilos). Es inespecífico especialmente en pacientes inmunocomprometidos que pueden tener otras micobacterias (**Huggett. J.F y otros 2003**).

Figura 2. Tinción de Ziehl-Neelsen de esputo positivo para micobacterias



Fuente: www.courses.ahc.umn.edu/medical-school

4.1.1.2 Tinción de Kinyoun. Está modificada para evitar el calentamiento. Los microorganismos aparecen como bacilos arrosariados y algo doblados de 2 a 4 μm de longitud y 0.2 a 0.5 μm de ancho. En el esputo, a menudo se ubican paralelos o dos microorganismos se adhieren en un extremo para formar una V. Se necesita la presencia de 10000 microorganismos/mL de esputo para la positividad del frotis, por ello un solo microorganismo en una baciloscopia es muy sospechoso.

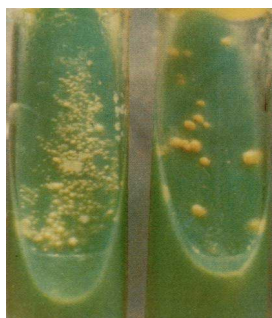
4.1.1.3 Auramina. La baciloscopia también puede hacerse mediante la tinción con fluorocromos, la cual mantiene los principios de ácido-alcohol resistencia. La fluorescencia permite observar la presencia de micobacterias de manera más rápida y a menor aumento, lo cual disminuye el tiempo de observación. Este método es especialmente útil en laboratorios con alta demanda. La desventaja es

que el método requiere de equipo más costoso como el microscopio de fluorescencia. La sensibilidad es igual al ZN.

Ulukanligil y col. Compararon dos métodos, auramina y el ZN en un total de 465 muestras obtenidas de 295 pacientes con el fin de determinar la sensibilidad para detectar micobacterias, ellos demostraron que la sensibilidad de una muestra por fluorescencia es del 83%, 2 y 3 muestras 92%, frente 61%, 66%, 80% respectivamente, con el ZN (**Ulukanligil, et al., 2000**).

4.1.2 Cultivo. Los métodos de cultivo utilizan medios sólidos o líquidos. Las muestras de esputo o de tejido necesitan licuefacción-decontaminación inicial; que se realiza más comúnmente con *N*-acetil-L-cisteína como mucolítico en solución de hidróxido de sodio al 1%. Esto destruye a otros microorganismos, mientras que las micobacterias están relativamente protegidas por sus paredes celulares ricas en ácidos grasos. Luego la muestra se neutraliza, centrifuga, y el sedimento se inocula en medios. Los líquidos no contaminados o los tejidos normalmente estériles no deben decontaminarse, ya que se produce cierta pérdida de viabilidad de las micobacterias (Figura 3).

Figura 3. Cultivo de *M. tuberculosis*.



4.1.2.1 Cultivo Ogawa- Kudoh (OK): Consiste en homogenizar la muestra para luego tomar la partícula útil con un hisopo estéril, introduciéndolo posteriormente

en un tubo de ensayo con hidróxido de sodio (NaOH) al 4% durante 2 minutos para eliminar la flora acompañante. Posteriormente se retira el hisopo y se siembra. Este método, por ser más sencillo y menos costoso, puede ser implementado en cualquier laboratorio de bacteriología y en el trabajo de campo. El cultivo por OK se utiliza extensamente en el Japón, el sudeste de Asia y en Colombia, aportando resultados similares a los obtenidos a través del método de Petroff con el medio de Lowestein-Jensen **(Waard J., 1999)**.

4.1.2.2 Medios de cultivo líquido: Son más rápidos y sensibles que el cultivo en medios semisólidos (Lowestein Jensen) pero con la desventajas de presentar dificultades para reconocer crecimientos mixtos de bacterias, morfología y conteo de colonias (de mucha utilidad en casos de retratamiento) y mayores problemas de contaminación. Los exámenes que detectan tempranamente crecimiento no son específicos de *M tuberculosis*. Los medios de cultivo líquido pueden ser radiométricos y no radiométricos.

4.1.2.3 Radiométricos: Bactec 460, es uno de los avances más importantes en cuanto a diagnóstico microbiológico. Detecta automáticamente el crecimiento bacteriano a través del CO₂ producido por la bacteria al metabolizar el sustrato marcado con C¹⁴. Este método posibilita un diagnóstico mas temprano pues puede detectar crecimiento del bacilo en una semana en pacientes con baciloscopia positiva y en dos semanas en aquellos con baciloscopia negativa, más 4 – 5 días para la identificación de *M. tuberculosis* **(Fraser, et al., 2002)**. Este es un método más sensible que el cultivo convencional (70-95% vs 60- 80% respectivamente) **(Fraser, et al., 2002)**, no se requieren subcultivos para efectos de identificación ni sensibilidad antimicrobiana. Entre las desventajas se encuentran, que es un método laborioso, emplea radioisótopos; el costo del equipo, reactivos y mantenimiento es alto, y existe potencial formación de aerosoles que ponen en

riesgo de infección al personal del laboratorio. Se justifica su uso solo en laboratorios regionales de referencia (**Caminero, 2003**).

4.1.2.4 No radiométricos: Existen también métodos de cultivo líquidos que no emplean radioisótopos (Mycobacteria Growth Indicator Tube System (MGITS), MBBAC, ESPII) con iguales ventajas al anterior y además que son automatizados, incorporan al medio de cultivo un compuesto que emite fluorescencia, al descender la tensión de oxígeno, cuando este ha sido consumido a consecuencia del crecimiento bacilar. Su costo imposibilita su uso en los países de mayor prevalencia de la enfermedad.

4.1.2.5 Medios de cultivo bifásico no radiométrico (MBSeptiCheck): Los frascos contienen 20 ml de caldo 7H9 de Middlebrook, además del medio sólido. Este método de cultivo presenta igual sensibilidad, aunque menos rapidez que BACTEC, sin utilizar radioisótopos. Tiene también la desventaja de los costos. No permite estudios de sensibilidad y frecuentemente falla en la identificación del bacilo.

4.1.2.6 Hemocultivos: Se han desarrollado debido a la frecuencia de bacteremia de *M. avium-intracelular* y de *M. tuberculosis* en pacientes con SIDA severamente inmunodeprimidos. Utilizan la técnica de lisis-centrifugación.

4.1.2.7 Nuevas técnicas de Identificación

Los estudios rutinarios de identificación son efectuados por técnicas bioquímicas que implican lentitud, complejidad y falta de reproducibilidad, por lo que se han desarrollado nuevas técnicas de identificación que incluyen el Test de NAP en Bactec 12B, la cromatografía y la identificación por métodos moleculares.

Test de NAP en Bactec 12B: Un precursor del cloranfenicol (p-nitro-alfa-acetilamino-beta-hidroxipropiofenona) inhibe el crecimiento del complejo *M tuberculosis*, de tal manera que la muestra a identificar se inocula en dos frascos Bactec 12B, uno de los cuales contiene NAP. Si en dicho frasco no crece la micobacteria, significa que pertenece al Complejo *M. tuberculosis*.

Identificación por Cromatografía: Las micobacterias tienen una pared celular muy rica en lípidos. La composición de la pared lipídica de cada especie es específica. Se pueden separar grupos de micobacterias por cromatografía de capa fina e identificarse por cromatografía de gases. El estudio es altamente específico pero su costo es muy elevado para ser implementado en países de bajos recursos.

4.2 Criterio Clínico

Las manifestaciones más sugerentes de TB pulmonar son la tos y la expectoración; por ello se ha recomendado que personas con más de 15 días de tos, y expectoración sean estudiadas para diagnóstico de TB (**WHO, 2004**). Estos son denominados “sintomáticos respiratorios”, además las personas con TB pueden tener síntomas comunes a otras enfermedades como lo son la fiebre, el cansancio, la falta de apetito, pérdida de peso, depresión, sudor nocturno y disnea en casos avanzados.

4.3 Criterio Histopatológico

Histológicamente, se observan granulomas confluentes, formados por células epitelioides rodeadas por una zona de fibroblastos y linfocitos donde suelen existir células gigantes de tipo Langhans. En el centro de estos tubérculos suele haber cierto grado de necrosis (caseificación), cuya intensidad depende por entero del

grado de sensibilización del paciente y de la virulencia de los microorganismos **(Robbins, 2006)**. Cuando se sospecha que existen lesiones tisulares, el diagnóstico se confirma mediante frotis, tinciones histológicas y cultivos de los microorganismos ácido-resistentes.

4.4 Criterio Radiológico

El estudio radiológico mediante rayos X es un apoyo diagnóstico de TB pulmonar en los casos de bacteriología negativa, aunque una radiografía anormal de tórax no hace diagnóstico de TB por sí sola y la correlación clínico-radiológica es de mayor valor **(Hopewell, et al., 2006)**.

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. En un estudio de la India de 2229 pacientes examinados fluoroscópicamente, 227 fueron clasificados como con tuberculosis, de ellos 81 pacientes tuvo cultivo negativo (36%) y se encontraron 31 (1.5%) con estudio considerado normal pero con cultivos positivos **(Caminero, 2003)**

4.5 Criterio Inmunológico

La prueba tuberculínica es el único método aceptado universalmente para el diagnóstico de la infección tuberculosa, y está basada en el hecho que la infección produce hipersensibilidad retardada, e indica que el sistema T linfocito/macrófago de una persona es capaz de reconocer los antígenos de la micobacteria. Ese reconocimiento (inmunidad mediada por células) es el resultado de la exposición previa del huésped al antígeno, usualmente a través de anteriores infecciones. En consecuencia, en el caso de la prueba cutánea con la tuberculina, una respuesta

positiva indica infección previa con el bacilo. Sin embargo, esa positividad podría indicar también infección con micobacterias no tuberculosas o previa vacunación con bacilo de Calmette-Guérin (BCG) **(ATS, 200)**.

El material desarrollado por Koch y llamado tuberculina vieja (OT), fue luego remplazado por uno más seguro y específico, el derivado proteico purificado (PPD). Más adelante, un lote de ese material, fue designado PPD-S y adoptado como referencia internacional, el cual trae 5 unidades (UT) por 0.1 mL. En Colombia, y en la mayor parte del mundo, se usa la tuberculina RT23, con una potencia superior a la PPD-S y trae 2 UT por 0.1 mL, equivalente a las 5 UT de la PPD-S (Figura 4).

Figura 4. Inyección intradérmica de PPD para la realización del test de Mantoux



Después de ocurrida la infección primaria, los linfocitos T derivados de la médula ósea circulan por la sangre por largos períodos de tiempo (meses a años); una posterior estimulación con antígenos similares (la tuberculina) produce una reacción local mediada por esas células, y esa reacción cutánea inflamatoria permite su apreciación por una induración eritematosa visible y palpable, acompañada algunas veces de manifestaciones sistémicas como fiebre y adenitis regional. Esa respuesta a la aplicación de tuberculina comienza entre las 4 a 6 horas, alcanza su máxima expresión a las 48 a 72 horas y puede persistir por varios días.

La prueba con la tuberculina está indicada cuando de su resultado derive una intervención terapéutica o no, que esencialmente son: la prevención de la infección en los no infectados (BCG), la prevención de la enfermedad en los ya infectados (tratamiento de la infección latente), y en el diagnóstico de los ya enfermos (tratamiento de la TB activa). Por tanto, en todos los casos mencionados en la Tabla 1 está indicada la aplicación del PPD.

Deben tenerse en cuenta algunos hechos derivados de estudios epidemiológicos y clínicos, como son los falsos negativos, ya sea asociados con la misma tuberculina (pérdida de poder por mal almacenamiento, contaminación), con el método de administración (inyección subcutánea), con su lectura (falta de experiencia del lector, sesgo y error de registro), a estados mórbidos de la persona estudiada (enfermedades virales, vacunación reciente, desnutrición, consumo de inmunosupresores, alteración del estado inmune en ancianos, leucémicos, sarcoidosis, superinfección tuberculosa y SIDA **(ATS, 2000; Pesanti, 1994)**

En zonas con alta prevalencia se recomienda este tratamiento preventivo a todos los individuos VIH positivos independiente del resultado del PPD **(Caminero, 2003)**.

No hay ningún método que permita distinguir una reacción tuberculínica producida por una previa vacunación por BCG de aquellas causadas por infección TB. Sin embargo, en adultos en estudio de posible TB, una reacción a tuberculina de ≥ 10 mm, debe ser considerada y evaluada como una infección TB reciente y no por causa de vacunación BCG en la infancia **(CDC, 1996)**

Tabla 1. Indicaciones de la Sociedad Torácica Americana de interpretación PPD.

Induración		
≥ 5 mm³	≥ 10 mm³	≥ 15 mm³
Infectados de VIH. Contactos recientes de tuberculosos infectantes. Persona con radiografía de tórax sospechosa de TB antigua. Inmunosuprimidos e ingesta crónica de esteroides.	Provenientes de alta prevalencia sin otros factores de riesgo. Trabajadores de la salud. Población carcelaria, drogadictos, silicóticos, gastrectomizados, diabéticos, insuficiencia renal, leucemias, linfomas, Ca. Cabeza y cuello, desnutridos. Infantes y adolescentes expuestos a adultos de alto riesgo.	Sin factores de riesgo.

4.5.1 Prueba tuberculínica y VIH. Durante la infección por VIH, la reactividad tuberculínica disminuye a medida que cae el recuento de células CD4. En un estudio de pacientes con TB activa se demostró una induración de 10 mm o mayor a 5 UT sólo en el 60% de las personas con infección por VIH y en el 35 % de los que no presentaban SIDA (**Jhonson, et al., 1992**). La induración de 5 mm en personas con infección por VIH es suficiente como para justificar la quimioprofilaxis (**CDC, 1991**); incluso se sugirió que una induración de 2 mm se debe considerar positiva en este contexto.

4.5.2 Ensayos de liberación de citoquinas. La influencia y limitaciones que tiene la TB para el diagnóstico de la infección tuberculosa puede ser en parte emplear unas pruebas diagnosticas con anticuerpos que no sean compartidos con el BCG (Bacillo de Calmette Guerin) como el Quantiferon TB la cual se dispone comercialmente y ha sido aprobado por la Food and Drug Administración de los Estados Unidos para el diagnóstico de TB latente.

El método es el siguiente se mezclan muestras de sangre con antígenos, incubándose por 16 a 24 horas. Los antígenos incluyen a la tuberculina, ESAT 6 Y CFP10, estos últimos ausentes en *M. bovis* BCG. Se incluyen controles de calidad. Si el paciente tiene infección por *M. tuberculosis*, sus linfocitos CD4+ y CD8+ reconocerán la tuberculina y el ESAT 6 y el CFP10 y liberarán Interferón gamma. Los resultados están basados en la proporción de IFN-g liberado. Esta prueba comparada con la tuberculina, no requiere una segunda visita para la medición de los resultados pero tiene en contra la necesidad de laboratorios debidamente equipados y el mayor costo. En el presente se recomienda su uso para el tamizaje de pacientes con riesgo bajo o moderado de TB (**Shluger, 2001**).

4.5.3 Diagnóstico serológico. En las últimas dos décadas se han multiplicado los estudios investigando el valor de diferentes test en el diagnóstico de la TB probando diferentes antígenos con diferentes técnicas. Para buscar anticuerpos la técnica enzimoimmunoanálisis (ELISA) parece ser la que ofrece mayores ventajas. Los antígenos que ofrecen mejores ventajas son los de naturaleza proteica y lipídica. Se han utilizado como antígenos filtrados crudos de bacilos tuberculosos, PPD, antígeno 5 y 6 de *M tuberculosis*, glicolípidos micobacterianos SAG A1. B1 y C, factor cordón. La sensibilidad varía de acuerdo al antígeno, nivel de corte prevalencia de la enfermedad. Sin embargo el desconocimiento en cuanto a la dinámica de aparición de anticuerpos, su duración, permanencia después de haber sido curada la enfermedad, las reacciones cruzadas, etc., producen dificultades en la interpretación de los resultados. Los mayores logros en cuanto a sensibilidad se han logrado en casos de TB pulmonar con baciloscopia positiva (65-85%), esta disminuye cuando se trata de TB baciloscopia negativa o TB extrapulmonar. En definitiva, los test serológicos brindan apoyo en el diagnóstico de la TB solo en limitadas circunstancias (**Caminero, 2003**).

4.6 Otros procesos coadyuvantes del diagnóstico

Adenosinadeaminasa (ADA)

Es una enzima derivada del metabolismo de las purinas, cuya cantidad se encuentra elevada en los exudados provenientes de pleuresías, peritonitis, pericarditis y meningitis tuberculosa e incluso en suero de enfermos con TB activa.

La aplicación más útil de esta técnica es en el diagnóstico de la meningitis tuberculosa y en el diagnóstico diferencial entre pleuresías tuberculosas y neoplásicas, ya que aunque la ADA también está elevada en el líquido pleural de los empiemas, artritis reumatoidea y algunos linfomas, estas últimas condiciones son más fáciles de diferenciar clínicamente. Los valores de referencia normales para el líquido Pleural < 40 U/L y para LCR < 3 U/L.

4.7 Técnicas de Biología Molecular

4.7 .1 Técnicas de hibridación. La Biología molecular ha permitido la detección de la secuencia de ADN o ARN de diferentes micobacterias. Se han preparado sondas con secuencias de ácidos nucleicos complementarios a las secuencias de ADN o ARN de diferentes especies (entre ellas la de *M. tuberculosis*, *M avium*, *M Kansasii*, *M gordonae*.) las cuales están marcadas con isótopos radiactivos (sondas calientes) o sustancias cromógenos (sondas frías). La sonda genética es capaz de fijarse o hibridarse con su fragmento homólogo de la muestra en estudio, la cual ha sido previamente desnaturalizada por medios físicos. La hibridación de la sonda a su fragmento homólogo se detecta fácilmente gracias al marcador incorporado. Las principales ventajas de estas técnicas son la rapidez y la especificidad. Su desventaja es el costo (**Caminero, 2003**).

4.7.2 Técnicas de amplificación. La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de ADN, generando millones de copias a partir de una sola molécula. Es un método simple que provee alta sensibilidad en la detección, al menos semejante a la del cultivo, combinada con la especificidad de las sondas **(Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1987)**.

La PCR se puede aplicar en diferentes versiones:

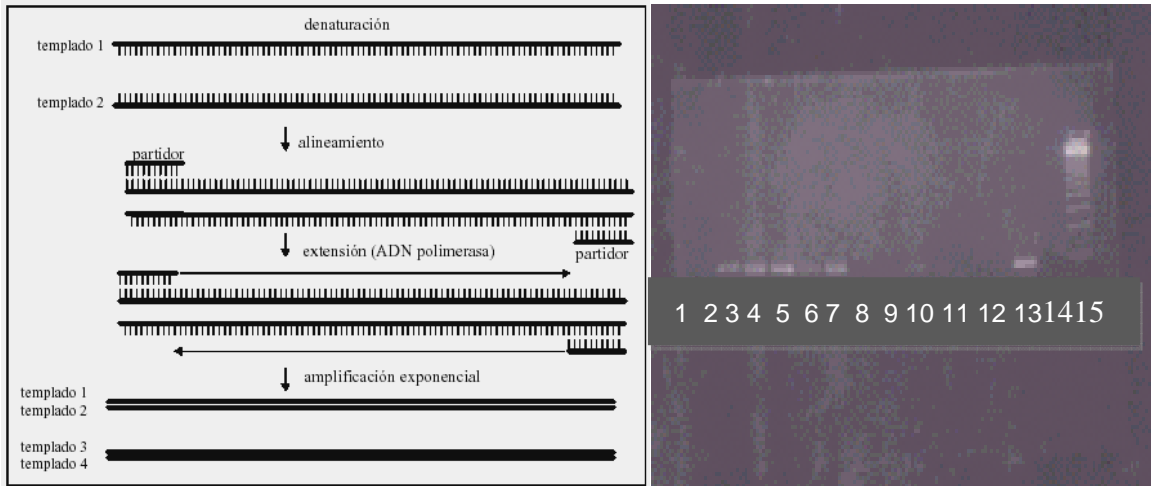
- Amplificar con cebadores apropiados y detectar después un fragmento específico de una determinada especie por electroforesis y tinción con bromuro de etidio **(Caminero, 2003)**.
- Amplificar un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias y después identificarla por medio de sondas genéticas específicas.
- Amplificar un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias, someterlas a lisis con enzimas 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 (PCR-RFLP) es de gran utilidad en la identificación rápida de las especies de micobacterias.

La PCR es una técnica “in vitro” que imita la habilidad natural de duplicar el ADN. En el campo del diagnóstico clínico, los laboratoristas pueden tomar una muestra mínima de material genético, copiar la secuencia específicas 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 PCR, ideada por

Kary Mullis y desarrollada por un equipo de científicos de la Corporación Cetus, fue publicada por primera vez el año 1985 en la revista científica Science y es reconocida como una de las herramientas más poderosas de la Biología Molecular.

En un primer paso, el ADN es desnaturalizado a 94°C. En un segundo paso, bajo condiciones experimentales adecuadas, los iniciadores (*primers*) de la reacción, oligonucleótidos de 15 a 30 pares de bases (p.ej, hibridan en secuencias del genoma conocidas y separadas de 100 a 2000 p.b. del ADN diana o molde. Cada iniciador se une a una cadena, con sus extremos 3' apuntándose entre sí. La temperatura de esta hibridación depende de la longitud de los iniciadores y de su proporción en G+C; en cualquier caso, a más temperatura la especificidad de la reacción es mayor. En el tercer paso, el fragmento del ADN localizado entre los iniciadores es rápidamente amplificado utilizando una enzima polimerasa de ADN procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*, que actúa a 72°C. Esta amplificación se lleva a cabo añadiendo desoxinucleótidos trifosfato, complementados a la cadena de ADN molde, en los extremos 3' de los iniciadores. Por lo tanto, el fragmento de ADN se duplica en cada ciclo, obteniéndose una copia de cada una de las cadenas. La reacción vuelve a repetirse 30 o 35 ciclos, obteniendo replications sucesivas, Al finalizar 35 ciclos, la cantidad de ADN es teóricamente 2^{35} aunque la saturación de la enzima, la hibridación del ADN diana y otros factores limitan la amplificación. El rendimiento obtenido con esta reacción es suficiente, y el producto de la reacción puede ser detectado por hibridación (0,3 pg de ADN) o por electroforesis en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio (1-10 ng) (**McFadden, et al., 1990**) (Figura 5). La sensibilidad extremadamente alta de la técnica obliga a tomar precauciones para evitar la aparición de falsos positivos debido a contaminaciones, especialmente con producto de PCR (**Kwok, et al., 1989**).

Figura 5. PCR y detección del producto por electroforesis en gel de agarosa.



Fuente: Corvalan (2002)

3, 4, 5, 7, y 10: muestras positivas para *M tuberculosis*
 1, 9 y 14: controles de reactivos; 12 y 13 Control negativo y positivo, 15 marcados de peso molecular

La PCR puede aplicarse en una amplia variedad de muestras (cultivo puro, tejidos, líquidos biológicos) para detección de enfermedades hereditarias, tumores, microorganismos y en medicina forense. En todos los casos requiere que las células que contienen el ADN que va a ser amplificado estén lisadas para liberar su genoma, por lo que es necesario el desarrollo de un método de extracción del ADN adecuado a cada muestra. Precisa también conocer la secuencia de ADN específica que se quiere amplificar para la elección de los iniciadores y la puesta a punto de las condiciones óptimas para cada reacción, tanto respecto a los reactivos (concentraciones de iniciadores, polimerasa, deoxinucleótidos trifosfato, $MgCl_2$ y tampón de la reacción) como a la temperatura, duración de cada paso y número de ciclos (Innis, et al., 1990).

La utilización de la PCR, asociada al análisis de restricción enzimática, permite la separación de micobacterias y nocardias (Lungu, et al, 1994), así como la identificación de especies mediante la diferenciación de los patrones generados

por restricción enzimática con *HaeIII* de los fragmentos del gen que codifica la proteína de choque térmico de 65 kDa (*HSP*) amplificados. Esta técnica ha sido aplicada a micobacterias de crecimiento lento (**Plikaytis et al., 1992; Telenti et al., 1993; Vanechoutte et al., 1993**) y rápido (**Steingrube et al., 1995**).

La PCR se ha utilizado para el diagnóstico rápido de patógenos de crecimiento lento (**Guatelli, et al., 1989; Moser, et al., 1989; Van Eys, et al., 1989**), así como para la identificación de cultivos y la detección de microorganismos del complejo *M. tuberculosis* a partir de muestras humanas (**Brisson, et al., 1989; Boddingtonhaus, et al., 1990; Cousins, et al., 1991; Eisenach, et al., 1991; Buck, et al., 1992**), pero ha sido raramente utilizada para la detección de *M. avium* (**Kim, et al., 1994**). Aunque el procedimiento es muy sensible en cultivos, su sensibilidad es bastante menor a partir de muestras clínicas, especialmente tejidos (**Wards, et al., 1995**).

Estos sistemas permiten un diagnóstico de TB en tan solo unas pocas horas. Las pruebas de biología molecular PCR y otras actualmente en uso en el laboratorio para el diagnóstico de TB son: AMTDT (Gee-Probe), basado en la amplificación enzimática del RNA ribosómico, AMPLICLOR (*M. tuberculosis* PCR test, Roche Diagnostic Systems) 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 (**Ausina, et al., 1997; Brown, et al., 1999**). Sin embargo su aplicabilidad esta limitada por diferencias en: sensibilidad en algunos estudios menor que el cultivo, pero mayor que la baciloscopia y por el alto costo y baja disponibilidad en los diferentes países

Datos de la literatura, confirman excelentes resultados en especímenes respiratorios con tinción positiva, en lo que se basa la recomendación de su uso por la FDA para este tipo de muestras. Estas técnicas tienen una especificidad de

mas del 95% y una sensibilidad mayor del 95% en pacientes con baciloscopia positiva (**Piersimoni and Scarparo, 2003; Zahrani, 2000**). Sin embargo hay controversia para el uso de estos métodos en muestras extrapulmonares y muestras con baciloscopia negativa; algunos reconocen su utilidad para el diagnostico de estas formas de TB (**Piersimoni and Scarparo, 2003**).

4.7.2.1 Secuencia IS6110 (elemento móvil de ADN). Los elementos móviles son secuencias de ADN capaces de excindirse e integrarse en numerosos lugares del cromosoma, cambiando de posición de un lugar a otro dentro del genoma, o desde éste a elementos extracromosómicos o bacteriófagos, independientemente de los sistemas del hospedador. Estos elementos se han encontrado en la mayoría de los organismos estudiados; muchos contienen genes que confieren resistencia a antibióticos, determinantes de patogenicidad y resistencia a metales pesados o enzimas. Un tipo especial de elementos móviles son los transposones (Tn), piezas de ADN que pueden alcanzar varios miles de p.b., que incluyen genes de resistencia a antibióticos, y que se clasifican según el tipo de resistencia que confieren.

Los elementos móviles más pequeños son las secuencias de inserción (IS del inglés insertion sequence). Su tamaño varía entre 800 y 2.500 p.b. (están clasificadas por tamaño en IS1, IS2, IS3, etc...). Se encuentran, en número muy variable, tanto en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas como en Asqueas, estando presentes en el cromosoma, plásmidos y bacteriófagos. Las secuencias de inserción contienen las funciones necesarias para la transposición y secuencias cortas, repetidas e invertidas, en sus extremos. Algunas secuencias de inserción forman parte de transposones que proporcionan resistencia a antibióticos. Algunos de estos elementos no tienen un lugar específico de inserción y se integran aleatoriamente en el cromosoma, otros tienen puntos específicos de integración,

llamados “*hot spots*”. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la transposición; la transposición replicativa y la transposición conservadora (**Pato, 1989**). En algunos casos se ha demostrado que las secuencias de ADN repetitivas son específicas de especie.

Se conocen diversos elementos móviles en las micobacterias. El *Tn610* aislado de *M. fortuitum* (**Martín, et al., 1990**), confiere resistencia a sulfonamidas; contiene un fragmento central homólogo a las secuencias de los transposones de la familia *7h21*, y está flanqueado por dos IS6100 relacionadas con la familia IS6. La IS6900 relacionada con la familia IS6110, hallada en una cepa de *M. tuberculosis* aislada de un paciente con la enfermedad de Crohn, aparece de 15 a 20 veces en esta especie (**McFadden, et al, 1987; Creen, et al, 1989**). La IS6901 (**Kunze, et al., 1991**) y la IS1245 se encuentran en algunas cepas de *M. avium* (**Bono, et al., 1995**).

IS6110 es una secuencia repetitiva; ésta representa secuencias de ADN dispersas en los genomas bacterianos con actividad de transposición (**Fomukong, et al., 1994**).

La IS6110 se aisló a partir de la cepa de *M. tuberculosis* H37rv (**Thierry, et al, 1990**). Está relacionada con la IS3411, una secuencia de inserción de un transposón de *E. coli*, el *Tn3411*, con genes para la utilización del citrato (**Ishiguro, et al., 1988**). La IS6110 tiene 1.361 p.b. y en sus extremos incluye una repetición de 28 p.b. complementarias e invertidas, 3 mal emparejadas, así como otras 3 p.b., probablemente del ADN diana, con repetición directa (**Thierry, et al, 1990**). Esta estructura es homóloga a la encontrada en IS3411 e 183 (**Timmerman, et al., 1985; Prere, et al., 1990**). Contiene además 2 marcos o zonas de lectura abierta (*orf* u “*open reading frame*”) similares a los de IS3411. Se ha detectado en

los microorganismos del complejo *M. tuberculosis*, pero no en micobacterias no pertenecientes a éste, incluyendo *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, etc... **(Thierry, et al., 1990; Plikaytis, et al, 1991)**. El elemento 1S986, aislado de *M. tuberculosis* **(Zainuddin, et al., 1989; McAdam, et al., 1990)** y el 1S987 de *M. bovis* **(Hermans, et al, 1991)** difieren solamente en escaso número de p.b., por lo que son considerados el mismo elemento.

Desde la década de los 80 hasta la actualidad numerosos estudios se han publicado acerca del PCR para identificación de micobacterias utilizando diversos fragmentos del ADN y ARN de *M. tuberculosis* y otras micobacterias, entre ellos el gen 65 kDa, el de 38 kDa, el gen para el Ag 85b, MPB 64, Mtp 40, la secuencia de inserción IS6110 y ARN ribosomal **(Baldeviano, et al., 2007)**. La prueba más utilizada en protocolos caseros de PCR es la basada en IS6110, fragmento que se encuentra por lo general en forma repetida en el genoma de las micobacterias del Complejo *M. tuberculosis* **(Mahaisavariya, y otros, 2005)**.

Los estudios muestran una gran variabilidad en cuanto a los procedimientos utilizados para la extracción del ADN, la amplificación, la detección del producto amplificado, el número y el tipo de pacientes y muestras examinadas lo cual corresponde también con la notable variación en las cifras de sensibilidad y especificidad reportadas entre los trabajos publicados, en relación con PCR para diagnóstico de TB con IS6110.

Chakravorty, et al., (2005) reportaron en 99 muestras extrapulmonares colectadas de 87 pacientes; examinadas con baciloscopia, cultivo y PCR, sensibilidad del 21.1%, 79% para cultivo y al utilizar PCR simultáneamente con la secuencia devR la sensibilidad aumentó obteniendo valores de sensibilidad y especificidad para

devR 83% y 93.8%, IS6110 66.7% y 75%, y combinadas 87.5% y 100%, respectivamente, en muestras de fluido pleural, tejido de biopsia pleural, y ganglio linfático. Este estudio muestra claramente como los métodos microbiológicos son poco efectivos cuando se trata de diagnosticar la TB extrapulmonar.

Negi et al (2006) examinaron muestras de 168 pacientes por ZN, cultivo LJ, cultivo radiométrico BACTEC 460 y por PCR obteniendo una sensibilidad de 35.2%, 47.1%, 53.4% y 74.2% respectivamente; una de las ventajas de la PCR es que sus resultados demoran de 2 a 3 días mientras que para el cultivo es necesario esperar de 2 a 8 semanas. Cegielski et al., (1997) compararon la técnica con el cultivo e histopatología en 36 muestras de fluido pericardico y 19 de tejido pericardial de 20 pacientes. La TB fue correctamente diagnosticada por cultivo en 15 pacientes (93%), por PCR en 13 (81%), y por histología in 13 de 15 (87%).

Villegas et al., (2000) compararon el PCR con otros métodos de diagnóstico no convencionales: ADA, IFN-g, en 140 casos de efusión pleural, 42 con TB pleural confirmada, 19 con TB pleural probable, 70 con etiología no TB y 9 con etiología indeterminada; obteniendo como resultado para ADA, IFN-g, y PCR sensibilidad del 88%, 85.7%, y 73.8% respectivamente, y especificidad del 85.7%, 97.1%, y 90% respectivamente. También Laborín et al., (2001) estudiaron muestras de expectoración y líquido pleural, donde incluyeron 79 pacientes con sospecha de TB pulmonar y baciloscopia positiva y un total de 212 muestras. En este estudio, la sensibilidad del PCR en las muestras de expectoración fue de 91% y del cultivo 97%. De acuerdo con estos reportes es necesario pensar en más estudios que evalúen la PCR en el medio donde se utiliza con el fin de establecerse como una herramienta para contribuir a un diagnóstico rápido y confiable, logrando así aportar a cortar la cadena de transmisión ya que mientras el cultivo demora de 2 a 3 semanas para poder dar un resultado definitivo, se está transmitiendo la TB.

Al comparar la sensibilidad de muestras diferentes al esputo; la sensibilidad del cultivo disminuye considerablemente, Rebollo et al., (2006) evaluaron la utilidad del PCR en muestras de sangre y orina de pacientes con TB probable comparado con un grupo control. Incluyeron 57 pacientes (43 con TB definida y 14 con TB probable) y 26 controles, en el Hospital Universitario de Madrid, encontraron una sensibilidad para PCR del 73.7% en comparación con el cultivo 33.3%, para las diferentes formas de TB (definida y probable). Zamirian et al., (2007) analizaron muestras de tejido de pericardio embebido en parafina de 30 pacientes con pericarditis constrictiva, 5 con TB examinadas histopatológicamente. La sensibilidad y especificidad de la PCR fue del 80 %.

Eing et al., (1998) analizaron 833 muestras con PCR casero IS6110 y una PCR comercial Roche Cobas Amplicor encontrando una sensibilidad del Amplicor de 66.4% y especificidad de 99.7% mientras la del PCR casero fue de 91.1% y 99.9% respectivamente. En las muestras tinción y cultivo positivo la sensibilidad fue para Amplicor 96.4% versus 100% y en tinción negativa fue 45.4 % y 63.6%, Este estudio demuestra que el test comercial tiene menos sensibilidad para amplificar que el ADN casero IS6110.

La gran variabilidad de sensibilidad y especificidad se ha relacionado con el uso de diferentes protocolos para la extracción del ADN, amplificación y detección del producto de PCR, la utilización de diferentes *gold estándar* para comparación: clínicos, tinción, cultivo. En el estudio Noordhoek, et al., (1996) evaluaron el desempeño del PCR en 30 laboratorios de 18 países cada uno con su protocolo de PCR el cual utilizaba diferentes secuencias blanco: IS6110 o el gen 16S o Roche Amplicor o Gen Probe MTD o para ARN, en 20 muestras preparadas, solo 4 laboratorios (16%), identificaron correctamente la presencia o ausencia de la micobacteria, 13 identificaron todas las muestras negativas y 7 todas las muestras

positivas. Suffys et al., (2000). Evaluaron resultados de PCR de 6 laboratorios de 6 países latinoamericanos diferentes procesando muestras con *M. tuberculosis* o micobacterias no TB mediante PCR para IS6110 encontraron una sensibilidad del 55% y especificidad del 71.6% para todas las muestras. Estos dos estudios coinciden que la falta de estandarización de la prueba explica en gran parte la variación de resultados de estos estudios y probablemente los de las publicaciones de la literatura como se muestra en el metanálisis de Sarmiento et al., (2003) sobre 50 estudios de PCR en muestras de TB tinción negativa se encontró una sensibilidad del PCR que varía del 9% al 100% y especificidad del 25% al 100% aunque solo el 15% tuvieron especificidad inferior al 90%. En estos estudios menos de la mitad reportaron métodos de control de calidad para evaluar resultados del PCR; los estudios que incluyeron aspirado gástrico tuvieron menor sensibilidad 50% que el esputo 75%, y este a su vez menor que el esputo inducido 89%. Los estudios que informan que realizar purificación del ADN tienen mayor sensibilidad pero menor especificidad. Los anteriores tres estudios indican la necesidad de estandarización de métodos en todos los pasos del PCR, uso de *gold standar* apropiados, reporte de resultados por pacientes descritos apropiadamente, uso de controles de contaminación y métodos de decontaminación, procesamiento en espacios adecuados y por personal entrenado.

4.7.2.2 LIMITACIONES DEL PCR. Además de la falta de estandarización de los protocolos, y las necesidades de infraestructura y personal entrenado, existen otras limitaciones como la detección por PCR de bacilos no viables haciendo que se mantenga positivo, después de haberse negativizado la bacteriología, aún seis meses después de finalizado el tratamiento (**Thomsen, et al., 1999**). Como no está precisado el tiempo máximo durante el cual persiste positiva la PCR, esta prueba puede ayudar al diagnóstico más no al seguimiento, no se recomienda el uso de esta técnica en pacientes con antecedentes de TB.

Una controversia para el amplio uso del PCR es el costo de la prueba. Cleeff et al., (2005) reportaron costos para un caso correctamente diagnosticado con ZN o por PCR de US\$41 y US\$67 respectivamente, y cuando se trata de costos incluyendo los casos cultivo negativo, el PCR fue más costo-efectivo: US\$382 vs. cultivo US\$412. Se evidencia entonces que la PCR es en costo-beneficio mejor que el cultivo en pacientes con baciloscopia negativa que en pacientes VIH, ZN positivo la PCR contribuiría a mejorar la especificidad del ZN comprometida en este grupo de pacientes por la posibilidad de enfermedad por micobacterias no TB.

El Consenso Argentino sobre el diagnóstico de TB (Sáenz y González, 2005) recomienda cumplir los siguientes requisitos: Centralizar la PCR en instituciones con los recursos necesarios para aplicarla de manera sustentable y con la calidad requerida por los estándares internacionales. Adopción de la PCR basándose en el análisis del costo, habitualmente moderado, ligado al cambio de conducta que originan en la práctica médica y minimizando los riesgos de resultados de falsos positivos, preparando los reactivos y amplificando el ADN en tres áreas separadas, en lo posible independientes del laboratorio donde se procesan muestras para la investigación bacteriológica de TB. Además se debe utilizar únicamente material desechable protegido contra aerosoles.

Para la interpretación del resultado el mismo Consenso Argentino sobre el diagnóstico de TB recomienda tener en cuenta que: Un resultado negativo no descarta TB activa, un resultado positivo se debe confirmar en una segunda muestra en el mismo laboratorio en un día diferente, se debe iniciar ó continuar el tratamiento cuando dos pruebas sean positivas en un paciente con sospecha de TB y un resultado negativo no descarta TB en un paciente sospechoso.

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

El Diseño del estudio fue de tipo descriptivo, cross-sectional, ambispectivo y de corte transversal.

5.1.1 Criterios de Inclusión. Todas las personas que por algún motivo fueron evaluados por sospecha de TB en los centros de atención médica de Popayán, como Hospitales (Hospital Universitario San José, Hospital Susana López de Valencia) y clínicas (La Estancia, I.S.S), y se les ordenó y realizó la prueba de PCR para TB en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular en la Universidad del Cauca; se buscó la historia clínica y archivos de los laboratorios de microbiología donde las muestra fueron procesadas para ZN y cultivo de micobacterias. Se incluyeron en el estudio todos los pacientes a quienes se les pudo hacer la revisión de la historia clínica según el formato (anexo A) y pudieron ser clasificados en uno de los grupos definidos en el estudio, por médico experto en enfermedades infecciosas en forma ciega al resultado de la PCR, así:

- **TB establecida:** Individuos con cuadro clínico sugestivo de TB y la muestra clínica positiva al menos una de las pruebas ZN o cultivo para *M. tuberculosis*.
- **TB clínica** Pacientes con cuadro clínico sugestivo sin ninguna otra patología que lo explique y muestras clínicas negativas para ZN y cultivo, y buena respuesta al tratamiento antituberculoso.

- **No TB:** Individuos a quienes se les diagnosticó otra patología que respondió al tratamiento específico y no requirieron tratamiento antituberculoso.

5.1.2 Criterios de exclusión. Pacientes que no cumplieron los criterios para ser clasificados dentro de alguna de las definiciones establecidas, por que no tuvieron el seguimiento apropiado, o por que no se alcanzaron a estudiar con los exámenes necesarios para documentar la TB u otra enfermedad debido a muerte o alta de la institución y no regresó a control, estos se denominaron indeterminados.

5.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

La tinción utilizada fue la del ZN y el cultivo en OK. El proceso se efectuó con los protocolos de la Red Nacional de Laboratorios en las respectivas IPS donde el paciente fue atendido o en el Laboratorio Departamental de Salud o en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca, con los protocolos de la Red Nacional de Laboratorios.

5.2.1 Muestras para el PCR casero IS6110. Las muestras que llegaron al laboratorio para el PCR correspondía a orina, esputo, LCR, líquido peritoneal, entre otras; Una vez llegadas las muestras al laboratorio se procede a la inactivación, con el protocolo estandarizado en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca (**Díaz y col., 2005**) de la siguiente forma:

A 500 µl de la muestra de esputo, ó a 1000 µl de las muestras de lavado bronquial, aspirado de ganglio, líquido peritoneal, líquido pleural, LCR, aspirado gástrico; ó al sedimento de 1500 µl de orina y a los fragmentos de biopsias, se les adicionó 500 µl de etanol al 75%. A las biopsias parafinadas se les removió la

parafina con xilol antes de adicionar etanol al 75%, cada muestra se centrifugó, se removió el sobrenadante, se secó y se guardó en el congelador de -20°C hasta la extracción.

5.2.2 Extracción de ADN de *M. Tuberculosis*. A cada muestra se le adicionó 320 µl de TE (Tris-EDTA), 50 µl de lizosima al 3.3% en TE, se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se adicionó 30 µl de SDS al 20% y se incubó por 1 hora a 65 °C. Se adicionó 50 µl de proteinasa K (7µg/mL) y se incubó toda la noche a 55 °C. Se adicionó 100 µL de perclorato de sodio 5 M, se incubó las muestras a T° ambiente por 10'; se agregó 500 µl de cloroformo isoamilico 24:1, se agitaron los tubos por 30`y se centrifugó por 15`a 14000 r.p.m. Se separó el sobrenadante con ADN, y se le adicionó etanol absoluto 1ml y 40 µl de acetato de sodio 3M, se congeló a -20 °C por 2 horas, se centrifugó a 14000 r.p.m por 15`y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó por 5`. Se dejaron secar a T° ambiente y se resuspendieron con 40 µl a 60 µl de TE, según el tamaño del botón. Se incluyó control de contaminación de extracción.

5.2.3 Amplificación de ADN. En la amplificación del ADN se utilizó primers INS1 (5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC), INS2 (5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA), para amplificar un fragmento de 245 pb de IS6110 del complejo de *M. tuberculosis*. La mezcla para PCR en un volumen final de 50µl contiene: Buffer para PCR 1X, MgCl₂ a 2,5 mM, dNTPs a 200 µM, INS1 e INS2 a 4ng/µl, Formamida al 0.02 %, Taq DNA polimerasa 1U. En cada procedimiento de amplificación se incluyó ADN de paciente control negativo, ADN de *M. tuberculosis* como control positivo y 2 a 3 controles de contaminación de reactivos sin ADN.

El programa de termociclado fue: denaturación a 94° C x 5` y 45 ciclos de denaturación a 94°C x 1', hibridación a 68° C x 1' y extensión a 72° C x 2' con autoextensión de 5" en cada ciclo y una extensión final a 72°C x 7'.

5.2.4 Detección del producto obtenido en la amplificación de ADN de *M. tuberculosis*. La detección del fragmento de 245 pb se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3 % en TBE 1X, teñido con Bromuro de Etidio 2.3 µg/mL; el fragmento se comparó con Marcador de Peso Molecular (Ladder 123 pb). Condiciones de corrida: 110V, 400 mA y 80w

5.2.5 Búsqueda de inhibidores: Para determinar si hubo presencia de inhibidores en las muestras PCR IS6110 negativas se les realizó un PCR con primers Bg1 (5' ACACAAACTGTCTTCACTAGC 3') y Bg2 (5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'), para amplificar un fragmento de 123 pb. La mezcla para PCR en un volumen final de 50µl contiene: Buffer para PCR 1X, MgCl₂ a 2,5 mM, dNTPs a 200 uM, Bg1 Bg2 a 4ng/µl, Formamida al 0.01 %, Taq DNA polimerasa 1U. El programa de termociclado fue: denaturación a 94° C x 4' y 45 ciclos de denaturación a 94°C x 1', hibridación a 57° C x 2' y extensión a 72° C x 1:30' con autoextensión de 5" en cada ciclo y una extensión final a 72°C x 7'. La detección del fragmento de 123 pb se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3 % en TBE 1X, teñido con Bromuro de Etidio 2.3 µg/mL; el fragmento se comparó con Marcador de Peso Molecular (Ladder 123 pb). Condiciones de corrida: 110V, 400 mA y 80w

5.3 ANÁLISIS

La información obtenida de las encuestas fue organizada en una base de datos en Excel y transportada a SPSS versión 10.0 para sus respectivos análisis.

1. Análisis exploratorio y descriptivo de las variables: año de ingreso, procedencia, edad, género, etnia, régimen de seguridad social, a estudiar

para observar como se comportaron, además para determinar si tienen significancia estadística, se aplicó pruebas estadísticas χ^2 .

2. Se calculó sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo del PCR con la de ZN y cultivo para diferentes formas de TB.

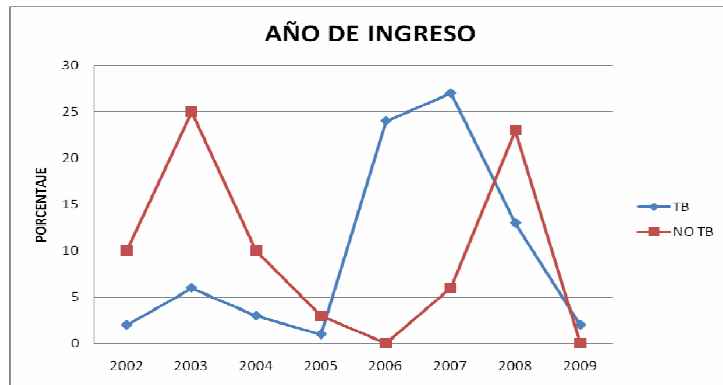
6. RESULTADOS.

Se revisaron 204 historias clínicas de las cuales se excluyeron 50 indeterminadas por no poder clasificarlas en los grupos definidos previamente, quedando incluidos en el estudio 154 pacientes: 78 con TB y 76 controles; las patologías de estos pacientes: el 13.1 % tenían NAC, 11.8% infección viral sistémica, 9.2 % enfermedad maligna e IVU y otras enfermedades en un porcentaje menor (ver Tabla 2). El periodo de ingreso de las muestras pacientes fue entre los años 2002 – 2009 (Figura 6).

Tabla 2. Patologías de pacientes no TB

Diagnóstico no TB	n (%)
Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC)	10 (13.1)
Infección viral sistémica	9 (11.8)
Enfermedad maligna	7 (9.2)
Infección de Vías Urinarias (IVU)	7 (9.2)
Infección respiratoria alta	6 (7.9)
Infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	5 (6.6)
Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	4 (5.3)
Meningitis no TB	4 (5.3)
Adenitis no TB	2 (2.6)
EPOC	2 (2.6)
Criptococosis	2 (2.6)
Transudado pleural o peritoneal	2 (2.6)
Secuelas de TB pulmonar	2 (2.6)
Nefropatía diabética	2 (2.6)
Infección por micobacterias no TB	1 (1.3)
Infección de herida quirúrgica	1 (1.3)
Absceso cerebral	1 (1.3)
Anemia hemolítica	1 (1.3)
Broncoespasmo	1 (1.3)
Encefalopatía metabólica	1 (1.3)
Eritema nodoso	1 (1.3)
Histoplasmosis	1 (1.3)
Linfadenopatía asociada a VIH	1 (1.3)
Encefalopatía por VIH	1 (1.3)
Mastitis inespecífica	1 (1.3)
Pielonefritis Xantogranulomatosa	1 (1.3)
TOTAL	76 (100)

Figura 6. Año de ingreso de los pacientes con TB y No TB



Los pacientes tuvieron una edad promedio en años de $42,69 \pm 21.21$, 53% mujeres para el grupo TB, etnia en su mayor porcentaje en la raza mestiza del 47% y la mayoría afiliados al régimen de seguridad social vinculada (36%). Los análisis realizados a los datos mediante la prueba X^2 no son significativos. En consecuencia se concluye que los grupos TB y no TB se asemejan desde el punto de vista de las características analizadas (Tabla 3).

Tabla 3. Características sociodemográficas de la población.

Variables		TB	No TB	<i>p</i>
GÉNERO	Masculino (%)	47	55	0.944
	Femenino (%)	53	45	
Edad en rangos	0 – 4 (%)	0	4	0.69
	5 – 14 (%)	9	4	
	15 – 29 (%)	26	18.4	
	30 – 59 (%)	43.6	55.3	
	60 y más (%)	22	18.5	
Etnia	Mestizo (%)	47.4	30.3	0.622
	Negro (%)	4	5.3	
	Indígena (%)	18	17.1	
	Blanco (%)	0	2.6	
	Sin dato (%)	31	45	
Régimen de seguridad	Vinculado (%)	18.2	19.5	0.363
	Subsidiado (%)	34.6	30.3	
	Contributivo (%)	23.7	23.7	

social	Sin dato (%)	6.6	6.6	
---------------	---------------------	------------	------------	--

Tabla 4. PCR versus BK y cultivo

ZN	PCR	
	Negativo	Positivo
Negativo	75	19
Positivo	1	51

Cultivo	PCR	
	Negativo	Positivo
Negativo	62	23
Positivo	0	44

$p < 0.001$

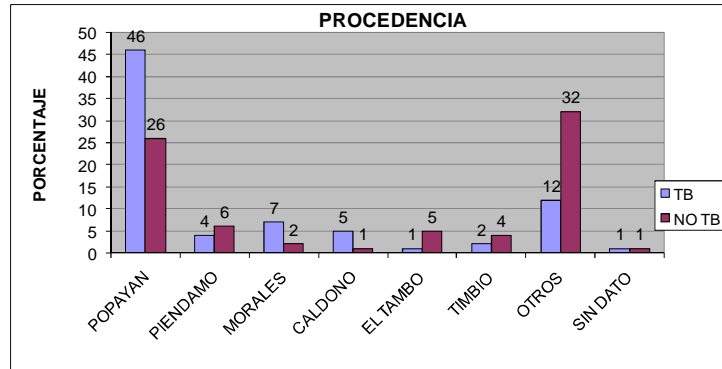
Mediante la prueba no paramétrica de McNemar para comparar dos muestras relacionadas (Tabla 4), se logra concluir lo siguiente:

Al comparar el método PCR con la prueba ZN, para identificar TB, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Las dos pruebas concuerdan al clasificar a 75 pacientes como negativos y a 51 pacientes como positivos. La diferencia radica en que hay 19 pacientes que no fueron definidos con TB por ZN pero si por PCR, mostrando la importancia d PCR para identificar TB. Sólo hubo 1 paciente que fue clasificado como TB por ZN y negativo por PCR.

Al comparar el PCR con el cultivo, para identificar TB, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Las dos pruebas concuerdan al clasificar a 62 pacientes como negativos y a 44 pacientes como positivos. La diferencia radica en que hay 23 pacientes que no fueron definidos con TB por el cultivo pero si por PCR, mostrando la importancia d PCR para identificar TB.

El 46% de los pacientes fueron procedentes del municipio de Popayán, el 7% de Morales, 5% de Caldon, 4% de Piendamó, 2 % de Timbio, 1 % del Tambo y un 12 % de otros municipios del departamento del Cauca. Lo que se concluye que la mayoría de pacientes con TB son procedentes del municipio de Popayán, mientras que los no TB son procedentes de otros municipios (Figura 7).

Figura 7. Procedencia de los pacientes con TB y No TB



De los 78 pacientes con TB, 55 tenían TB establecida y 23 TB clínica. De la forma de TB establecida, 49 son TB pulmonar con positividad para el PCR, ZN y cultivo del 97.9%, 97.9% y 80.8 % respectivamente y 6 con TB extrapulmonar con 100%, 66.7% y 100% respectivamente.

Para las formas de TB clínica 4 son TB pulmonar con PCR positivo del 100% y 19 con TB extrapulmonar con el 68.4% PCR positivo. El ZN y el cultivo fueron negativos en todos los pacientes con TB clínica. El PCR fue negativo en todos los casos del grupo no TB. El ZN y el cultivo de los pacientes examinados en este grupo también fueron negativos (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de PCR, ZN y Cultivo según forma de presentación de la TB

FORMAS DE TB		PCR n (% +)	ZN n (% +)	Cultivo n (% +)
PULMONAR	Establecida	49 (97.9)*	49 (97.9)	47 (80.8)
	Clínica	4 (100)	4 (0)	4 (0)
EXTRAPULMONAR	Establecida	6 (100)	6 (66.7)	6 (100)
	Clínica	19 (68.4)	17 (0)	14 (0)
NO TB		76 (0)	70 (0)	58 (0)

n: el total de las pruebas realizadas ; (% +) porcentaje de positividad de cada prueba

* La muestra PCR (-) fue ZN (+) y cultivo (-)

La mayoría de las muestras procesadas para TB establecida fueron de esputo, 48 con PCR y ZN positivos y 39 con cultivo positivo; seguido de lavado bronquial 2, ganglio axilar 2 y una de aspirado de tejido blando y biopsia de pericardio (ver Tabla 6).

Tabla 6. Tipos de muestras de pacientes con TB establecida

Muestras	TB ESTABLECIDA					
	N°PCR		N°ZN		N°Cultivo	
	+	-	+	-	+	-
Esputo	48	1	48	1	39	9
Lavado bronquial	2	0	2	0	1	0
Ganglio axilar	2	0	1	1	2	0
Aspirado de tejido blando	1	0	1	0	1	0
Bx de pericardio	1	0	1	0	1	0
Total	54	1	53	2	44	9

Para la forma de TB clínica al igual que la TB establecida la mayoría de muestras fueron de esputo: 8 PCR positivo, ZN negativo y 7 cultivo negativo; el resto de muestras fueron 3 de LCR, 3 líquido pleural, y 1 de Lavado bronquial, orina, biopsia de pericardio, aspirado gástrico, aspirado de secreción de ganglio, biopsia de ganglio cervical y líquido sinovial (Tabla 7).

Tabla 7. Tipos de muestras de pacientes con TB clínica

Muestras	TB CLINICA					
	N°PCR		N°ZN		N°Cultivo	
	+	-	+	-	+	-
Esputo	8	0	0	8	0	7
LCR	3	0	0	2	0	3
Líquido Pleural	2	1	0	2	0	1
Lavado bronquial	1	0	0	1	0	1
Orina	1	0	0	1	0	2
Bx de pericardio	1	0	0	1	0	1
Aspirado gástrico	1	0	0	1	0	1
Asp. de secreción de ganglio	0	1	0	1	---	---

Bx ganglio cervical	0	1	0	1	---	---
Bx parafinada pleura	0	1	0	1	0	1
Bx masa paravertebral cervical	0	1	0	1	0	1
Líquido sinovial	0	1	0	1	---	---
Total	17	6	0	21	0	18

La sensibilidad en TB establecida fue superior para el PCR 98.2% comparada con ZN 94.5% y el cultivo 83%. Para todas las formas de TB (establecida más clínica) la sensibilidad para el PCR, ZN y cultivo fue de 91%, 64.8% y 62 % respectivamente, con una especificidad del 100% (Ver Tabla 8).

Tabla 8. Sensibilidad, Especificidad, VPP Y VPN Del PCR, el ZN y el Cultivo

	TB Establecida			TB Clínica			TB		
	PCR	ZN	Cultivo	PCR	ZN	Cultivo	PCR	ZN	Cultivo
Sensibilidad (%)	98.2	94.5	83	73.9	0	0	91	64.8	62
Especificidad (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
VPP (%)	100	100	100	100	0	0	100	100	100
VPN (%)	98.7	95.9	86.6	92.7	76.6	76.3	91.6	74.4	68.2

VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo

7. DISCUSIÓN

En este estudio se mostró la utilidad de la prueba de PCR casero IS6110 con el protocolo estandarizado en el laboratorio de Inmunología y Biología molecular de la Universidad del Cauca en términos de sensibilidad y especificidad para identificar pacientes con TB de nuestro medio en comparación con los métodos basados en la microscopía que posee baja sensibilidad y especificidad y el cultivo que necesita de 2 a 8 semanas para un diagnóstico final.

La diferencia de la sensibilidad entre el cultivo (80.8%) y el ZN (97.9%); puede deberse a que revisando los datos se encontró que algunas de las muestras fueron enviadas en forma demorada desde las diferentes zonas rurales del departamento del Cauca. El tiempo prolongado para la siembra de la muestra en el medio de cultivo altera la viabilidad de las micobacterias; lo cual pudo influir en la baja sensibilidad del cultivo, pero no en la del PCR y el ZN que no requieren viabilidad.

La sensibilidad de este estudio para TB establecida pulmonar y extrapulmonar del 98.2% fue mayor a la encontrada en el estudio realizado por Suzuki, et al., (2006) quienes emplearon un kit comercial para PCR (Amplicor) en diferentes grupos de pacientes, entre estos para TB establecida encontraron una sensibilidad de 95,1%; mostrándonos que la PCR casera IS6110 podría usarse como método diagnóstico teniendo en cuenta que es un examen menos costoso comparado con los Kit comerciales.

En TB pulmonar establecida la sensibilidad del PCR y el ZN fue igual 97.9%; ofreciendo el PCR la ventaja de adelantar la clasificación de la micobacteria determinando si pertenecen al Complejo *M. tuberculosis* o son micobacterias no

TB, lo cual es importante sobre todo cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos que pueden ser afectados por estas últimas.

En el estudio de Díaz y col. 2005, la sensibilidad del 62.5% del PCR casero IS6110 en las 24 muestras líquidas evaluadas por las tres metodologías de pacientes con TB clínica definidas de acuerdo con lo aceptado por la OMS, comparable a la sensibilidad obtenida de los 23 pacientes con TB clínica del presente estudio 73.9%. De acuerdo a esto, el PCR sigue siendo en nuestro medio la única evidencia biológica de la presencia de *M. tuberculosis* en los casos hasta ahora definidos y tratados sobre bases únicamente clínicas, contribuyendo de esta manera a solucionar las limitaciones de los estándares de oro microbiológicos actuales, el ZN y el cultivo. Además la especificidad de la PCR es del 100%.

Se encontró PCR positivo en una muestra de orina procedente de un paciente con TB clínica cuyo PCR incluido en el análisis de un ganglio parafinado fue negativo, este hallazgo y el hecho de que 28 orinas de 28 pacientes con TB procesadas simultáneamente a la muestra analizada en el estudio, fueron positiva y 9 de de las orinas de los pacientes no TB fueron negativas; sugiere que la orina una muestra fácil de recolectar puede mejorar la sensibilidad del PCR para el diagnóstico de TB aún en pacientes con formas no renales de TB.

Una de las causas para la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de la prueba, informados en la literatura es la falta de estandarización en los protocolos de la extracción, amplificación, detección del producto y secuencia blanco utilizados en los diferentes estudios, siendo esta una limitante para la comparación de los diferentes resultados como fue reportado por Noordhoek, et al., (1996). Se requiere además un monitoreo de posibles inhibidores, para asegurar que no hay interferencia con la detección de la secuencia. En este estudio se buscaron

inhibidores los cuales nos indican que los PCR negativos no se debieron a inhibición de la amplificación.

Un aspecto evidenciado en el presente estudio es el haber encontrado 50 casos de pacientes con diagnóstico indeterminado debido a la falta de información o registros de laboratorio, falta de recolección de muestras o por falta de seguimiento a los pacientes o por fallecimiento sin realización de autopsias. Esto nos indica que 1 de cada 4 pacientes con sospecha de TB no se le establece el diagnóstico de su enfermedad y teniendo en cuenta que de los 154 incluidos en el estudio la mitad cumplieron las definiciones de TB, significando que 1 de cada 2 pacientes no han sido adecuadamente diagnosticados y tratados o por lo menos no se documenta adecuadamente en la historia. Esto sugiere que se debe revisar y fortalecer el programa de manejo de la TB en las instituciones de salud para lograr un adecuado diagnóstico y seguimiento. El resultado de la PCR, en estos individuos llamados indeterminados mostró una positividad en el 50% de ellos similar al 46% de los incluidos en el estudio, mostrando que la PCR realizada en una sola muestra puede contribuir a mejorar el diagnóstico superando barreras de tiempo, dificultad en tener 3 muestras, que puede estar determinando la alta proporción de diagnósticos indeterminados.

En resumen, el diagnóstico de la TB con 2 métodos tradicionales la tinción y el cultivo para micobacterias tiene aun grandes dificultades. Afortunadamente la PCR casera IS6110 implementada en nuestro medio, donde se dispone de condiciones de infraestructura, entrenamiento del personal y controles de contaminación y de inhibición y aplicada a nuestra población sospechosa de TB, muestra excelentes resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, en las diferentes formas de TB y en una variedad de muestras clínicas lo cual se convierte en beneficios para la atención en salud. Si se promueve y acepta su uso podría contribuir a mejorar la atención

de pacientes con sospecha de TB, detectando en forma rápida y temprana los enfermos y a lo mejor impactando en la disminución de la transmisión y en la solución de las limitantes actuales del diagnóstico. Finalmente nuestro PCR casero IS6110 puede implementarse en nuestro medio como herramienta diagnóstica si se tiene en cuenta que su sensibilidad fue del 98.2% para TB establecida, 73.9% TB clínica y del 91% par todas las formas de TB, y una especificidad del 100%, lo cual asegura que difícilmente una prueba positiva podría no deberse a TB.

8. BIBLIOGRAFIA

- ✓ ABADCO DL, and STERNER P. Gastric Lavage is better than bronchoalveolar lavage for isolation of M. tuberculosis in childhood pulmonary tuberculosis. *Pediatric Infect Dis* 1992; 11: 735-738.
- ✓ Alianza Alto a la Tuberculosis y Organización Mundial de la Salud. Plan mundial para detener la tuberculosis 2006-2015. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2006. p. 21-32.
- ✓ ATS: American Thoracic Society. Diagnostic standarts and clasification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-1395.
- ✓ AUSINA V. GAMBOA F, GAZOPO E *et al.* Evaluation of the semiautomated Abbott tt LCx Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1996 –2002.
- ✓ BALDEVIANO, Christian, LUNA, Carmen, CÁCERES Tatiana y CALDERÓN, Roger. Detección Sensible Y Específica De *Mycobacterium TB* a partir De Muestras Clínicas, Mediante La Amplificación De Un Elemento Repetitivo De La Familia REP13E12. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 2007; Vol. 24(1): 5-12.
- ✓ BARNES PP. BLOCH AB, DAVIDSON PT, SNIDER DEJ. Tuberculosis in patients with human inmunodeficiency virus infection. *N. Engi. .1. Mcd.* 1991; 324:1644-1650.

- ✓ BATES JH, STEAD WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med. Clin. North Amer.* 1993; 77:1205-1217.
- ✓ BODDINGHAUS B, ROGAIL T, SALIR T, BLUCKER II, BUTTGER FC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol* 1990; 28:1751-1759.
- ✓ BRISSON-NOEL A, OICQUEL B, LEEOSSIER D, LEVY-FREBAULT V, NASSIF X, HANCE AS. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; it 1069-1071.
- ✓ BUCK GE, O'HARA LC, SUMMERSGILL ST. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:1331-1334.
- ✓ BROWN TJ, POWER EG, and FRENCH GL. Evaluation of three commercial detection systems for *Mycobacterium tuberculosis* where clinical diagnosis is difficult. *J Clin Pathol* 1999; 52:193-197.
- ✓ BURGOS MV, MÉNDEZ JC, RIBÓN W. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. *Biomédica.* 2004;24 (Suppl. 1):188-201.
- ✓ CALDERON, Carlos y colaboradores. Guía 11: Guía de atención de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar), Bogotá. 2005.

- ✓ CAMINERO JA. Guía de la Tuberculosis para médicos especialistas. UICTER. 2003.
- ✓ CANETI O. Endogeneous reactivation and exogeneous reinfection. Their relative importance with regard to the development of non-primary tuberculosis. *Buil. Un. mt. Tuberc.* 1972; 47:116-122.
- ✓ CARTER CE. Comparative cervical test in deer. *Proc. N.Z. Vet. Assoc. Deer Br.* 1990. 5; 2:80-87
- ✓ CASTIBLANCO, César A. y LLERENA, Claudia. Tuberculosis en Colombia: análisis de la situación epidemiológica, año 2006. *Infectio* 2008; 12 (3): 159-73
- ✓ CEGIELSKI J. PETER, BLYTHE H. DEVLIN, ARTHUR J. MORRIS, et al.,. Comparison of PCR, Culture, and Histopathology for Diagnosis. *J Clin Microbiol*, Dec. 1997; Vol. 35, No. 12 p. 3254–3257.
- ✓ CDC: Center for Disease Control and Prevention. 1996, the role of BCG vaccine in the prevention and control of tuberculosis in the United States. *MMWR* 45: RR-4.
- ✓ COCOYOA, L.; OAXTEPEC, M. y MURELOS, S. IV Seminario Regional de la Tuberculosis. *Rev. Panam. Salud Public.* 1988; 11: 16-20.

- ✓ CLEEFF, M. VAN L. KIVIHYA-NDUGGA, W. GITHUI, L. NG'ANG'A, D. KIBUGA, J. ODHIAMBO, and P. KLATSER. Cost-effectiveness of polymerase chain reaction versus Ziehl-Neelsen smear microscopy for diagnosis of tuberculosis in Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005 9(8):877–883.
- ✓ CORBETT EL, De Cock KM. Tuberculosis in the HIV-positive patient. *Br J Hosp Med* 1996;56:200–4
- ✓ CORVALÁN, Alejandro. *Biología Molecular en Infectología Parte I: Desarrollo y Metodologías*. Rev. Chil. Infectol. V.19 n.1. Santiago. 2002; 5-13.
- ✓ COUSINS, DEBRA, and SUMMERSGILL JT. Use of Polymerase Chain reaction for Rapid Diagnosis of TB. *J Clin Microbiol*. Jan. 1991, p. 255-258.
- ✓ DAVIDSON RM, ALLEY MR, BEATSON NS. Tuberculosis in a flock of sheep. *N. Z. Vet. J.* 1970; 29:1-2.
- ✓ DIAZ, M. y colaboradores. Diagnóstico de tuberculosis en muestras líquidas por reacción en cadena de la polimerasa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2005. Vol 25 (2), abril-junio.
- ✓ DiPERRI G. *Lancet* 1989; 11:1502.
- ✓ EING B., BECKER A., SOHNS A., and RINGELMANN R. Comparison of roche Cobas ampliacor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2023-2029.

- ✓ EISENACH KD, CARE JH, BATES, and. CRAWFORD JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis* 1990; 161:977-981).
- ✓ ELÍNER JJ, HINMAN AR, DOOLEY SWI, et al. Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. *J. Infect. Dis.* 1993; 168:537-551.
- ✓ FOMUKONG NG, TANG TH, AL-MAAMARY S, IBRAHIM WA, RAMAYAH S, and YATES M. Insertion sequence typing of *Mycobacterium TB*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75(6):435-40.
- ✓ FOX JL. Coalition reacts to surge of drug-resistens TB. *ASM News* 1992; 58:135-139.
- ✓ GALVEZ, Alvaro y ANGEKY KA. Diagnosis of TB *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 684-7.
- ✓ GARCÍA LF, y JARAMILLO E. La tuberculosis: un reto que debemos enfrentar. *Biomédica* 2004;24 (Supl.1):5-8.
- ✓ GERDA T. NOORDHOEK, JAN D. A. van EMBDEN, and AREND H. J. KOLK. Reliability of Nucleic Acid Amplification for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an International Collaborative Quality Control Study among 30 Laboratories. *J. Clin. Microb.* 1996; Vol 34(10): 2522–2525
- ✓ GOODFELLOW M, WAYNE LO. Taxonomy and nomenclature. in *The Biology of the Mycobacteria*. Ratledge and Stanford (Eds). Academic Press, 1982.

- ✓ GOREN MB, et al. Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities. In Tuberculosis. Youmans GP (Ed). The W.B. Saunders Co. Pitiladelphia (USA) 1979:69-193.
- ✓ GORSEN, et al. Immunereactive substances of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 1985; 125:50-69
- ✓ GUATELLI, C, GINGERAS TR, RICHMAN DD. Nucleic acid amplification in vitro: Detection of sequences whit low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. Clin. Microbiol. Rev. 1989; 2: 217-226.
- ✓ HARRINGTON EJ. A numerical taxonomic study of some corynebacteria and related organisms. IT. Gen. Microbiol. 1966; 45:31-40.
- ✓ HERMANS PWM, VAN SOOLINGEN D, DALE JW, SHUITEMA ARJ, MCADAM RA, CATTY D, VAN EMBDEN JDA. The insertion element 1S987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infect. Immun. 1991; 59:2695-2705
- ✓ HOPEWELL P, PAI M, DERMOT M, UPLEKAR M, RaviglioneMC. International Standard for tuberculosis care. Lancet Infect Disc 2006; 6:710.
- ✓ HUGGETT, J.F. et al. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35. 2003; 1407–1412.

- ✓ INNIS MA, and GELFAND DH. Optimization of PCRs. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. 1990.
- ✓ ISHIGURO N, SATO G, et al. Nucleotide sequence of insertion sequence IS3411 which flanks the citrate utilization determinant of transposon Tn3411. J. Bacteriol. 1988; 170:1902-1906.
- ✓ KATO, Midori. Eficacia e impacto de la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de TB extrapulmonar. Rev Invest Clini 2002; Vol.54(6):509-514.
- ✓ KIM D-Y, CHO D-Y, NEWTON JC, GERDES IT, RICHTER E. Granulomatous myelitis due to Mycobacterium avium in a human. Vet. Pathol. 1994; 3 1:491493.
- ✓ KRAMER F, MODILEVSKY T, WALIANY AR, LEEDOM SM, BARNES PU. Amer. IT. Med. 1990; 89:451.
- ✓ KUNZE ZM, PORTAELS F, MCFADDEN SJ. Biologically distinct subtypes of Mycobacterium avium differ in possession of insertion sequence IS901. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2366-2372.
- ✓ KWOK S, HIGUCH R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339:237-238.
- ✓ LABORÍN, Rafael. Diagnóstico de TB. México. Revista Instituto Nacional Enfermedades Respiratorias. Enero/marzo 2001; Vol. 14 No. 1.

- ✓ LASZLO A. TB: Laboratory aspects of diagnosis. CMAJ 1999; 160(12): 1725-29.
- ✓ LUNGU O, LATTA PD. WEITZMAN I, SILVERSTEIN, S. Differentiation of Nocardia from rapidly growing Mycobacterium species by PCR-RFLP analysis. Diag. Microbiol. Infect. Dis.1994; 18:13-18.
- ✓ MAHAISAVARIYA, P., CHAIPRASERT, A., y KHEMNGERN, S. Detection and identification of *Mycobacterium* Species by polimerase chain reaction (PCR) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections. J Med Assoc Thai 2005; 88(1):108-13.
- ✓ MANDELL G L, BENNETT J E and DOLIN. Principles and practice of Infectious Diseases, 5a Ed. N.Y. Churchill Livingstone Inc., 2000. p. 2576-2578.
- ✓ MARTIN C, RANES M, GICQUEL B. Plasmids, antibiotic resistance and mobile genetic elements in mycobacteria. En: Molecular biology of the mycobacteria. McFadden JJ (Ed). Academic Press Ltd. London (UK). 1990.
- ✓ MASE S, NEG V, HENRY MC et al. Yield of serial sputum smear examination in the evaluation of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Geneva, Swizerland: Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR), World Health Organization, And Foundation for innovative New Diagnostics, (FIND) 2006.
- ✓ McSHANE H, Co-infection with HIV and TB: double trouble. International Journal of STD & AIDS 2005; 16: 95–101

- ✓ MILLER K, Scott MD, et al. Tuberculosis in pregnancy: interactions, diagnosis, and management. *Clinical Obstetrics and Gynecology*; volume 39(1), March 1996, pp 120-142.

- ✓ Ministerio de la Protección Social. Plan estratégico “Colombia libre de tuberculosis 2006-2015 para la expansión y fortalecimiento de la estrategia DOTS/TAS”. Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social, Dirección General de Salud; 2006.

- ✓ MORALES, Frumencio. *Neumología y cirugía de tórax*. 2003; Vol. 62 (2):92-95.

- ✓ MOSER DR, BROTHITWELL DR, UCKO PJ. Tuberculosis in ancient Egypt. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1989; 90:524-541.

- ✓ MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Mech. Enzymol.* 1987; 155:335-351

- ✓ OTEAD, MARTÍN C, VINCENT-LEVY-FRÉBAULT V, THIERRY D, GICQUEL B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:1252-1254.

- ✓ PATO CC, LIN SS, WU SY, ITUANG WM, CBSUG CH, LIN ITY. Re. detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured by specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. *Tubercle* 1989; 69:27-36.

- ✓ PARK DY, KIM JY, CHOI KU, LEE JS, LEE CH, SOL MY, et al. Comparison of polymerase chain reaction with histopathologic features for diagnosis of TB in formalin-fixed paraffin-embedded histologic specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127: 326-30.
- ✓ PARRISH NM, DICK JD, and BISHAI WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium TB* (review). *Trends Microbiol.* 1998; 6(3):107-12.
- ✓ PESANTI EL. The negative tuberculin test, HIV and anergy panels. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1699-1709.
- ✓ PIERSIMONI C and SCARPARO C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; p. 41: 5355-5365.
- ✓ PLIKAYTIS BB, EISENACH KD, CRAWFORD IT, SHINNICK TM. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction. *Mol. Cel. Probes* 1991; 5:215-219.
- ✓ PLIKAYTIS BB, PLIKAYTIS BD, YAKRUS MA, BUTLER WR, WOODLEY CL, SILCOX VA, SHINNICK TM. Differentiation of the slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 1815-1822.
- ✓ PRÉRE MF, CHANDLER M, FAYET O. Transposition in *Shigella*: isolation and analysis of 1S911, a new member of the IS3 group of insertion sequences. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 4090-4099.

- ✓ RAVIGLIONE MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *TB (Edinb)* 2003; 83(1-3): 4-14.
- ✓ REIDER HL, SNIDER DE, CAUTHEN GM. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:347–351.
- ✓ REBOLLO, Mary, SAN JUAN, Rafael., FOLGUEIRA, Dolores., PALENQUE, Elia. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of TB by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 56. 2006; 141–146.
- ✓ ROSSMAN, Milton and MaCGREGOR, Rob. *Tuberculosis.* McGraw-Hill. Philadelphia, 1994.
- ✓ SAIKI RK, SCBARF J, FALOONA F, et al. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985:1350-1354.
- ✓ SARMIENTO OL, WEIGLE KA, ALEXANDER J, WEBER DJ, and MILLER WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary TB. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3233-40.
- ✓ SHAFER RW, KIM DS, WEISS JP, et al. Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Medicine.* 1991;70: 384–397.
- ✓ Secretaria de Salud (SDS). República de Honduras. *Manual de normas de control de la tuberculosis.* Tegucigalpa. 2003.

- ✓ STARKE JR, and CORREA AG. Management of mycobacterial infection and disease in children. *Pediatric Infect Dis J* 1995; 14(6):45-470.
- ✓ STARKE JR, and JACOBS RF, Jereb J. Resurgence of tuberculosis in children. *J Pediatric* 1992; 120: 839-855.
- ✓ STEINGRUBE VA, GIBSON SL, BROWN BA, ZHANG Y, WILSON RW, RAJAGOPALAN M, WALLACE EJ. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapid growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 149-153.
- ✓ STYBLO K. Recent advances in epidemiological research in tuberculosis. *Advances in Tuberc. Res.* 1980; 20:1-63.
- ✓ SUZUKI, T., TANAKA, M., OTANI, S., MATSUURA, S., SAKAGUCHI, Y., y NISHIMURA, T. New rapid detection test with a combination of polymerase chain reaction and immunochromatographic assay for *Mycobacterium TB* complex. *Diagnostic Microbio and Infect Disease* 56 (2006) 275–280.
- ✓ THIERRY O, CAVE MD, EISENACH KO, CRAWFORD ST, BATES JH, OICQUEL B, GUESDON SL. IS6110, and IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucl. Acids Res.* 1990; 18:188 THOMSEN V O, KOK-JENSEN A, BUSER M, PHILIPPI-SCHULZ S, and BURKARDT H J. Monitoring treatment of patients with pulmonary tuberculosis: can PCR be applied? *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3601-7
- ✓ TIMMERNAN KP, ET AL. TU CPD. Complete sequence of IS3. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13:2127-2139.

- ✓ ULUKANLIGIL M, ASLANG and TASCI S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid-fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(6): 855-8.
- ✓ VAN-EYS GJJM, GRAVEKAMP C, GERRITSEN MJ. Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27:2258-2262
- ✓ VILLEGAS, Maria Virginia., LABRADA, Luz Angela., and SARAVIA, Nancy. Evaluation of Polymerase Chain Reaction, Adenosine Deaminase, and Interferon-g in Pleural Fluid for the Differential Diagnosis of Pleural TB. *Clinical Investigations.* Nov. 2000; 118.
- ✓ WAARD, J. Estudio de la sensibilidad del cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis en Venezuela. Caracas-Venezuela. Instituto de Biomedicina. 1999: 32.
- ✓ WARDS BJ, COLLIUS DM, DE LISLE GW. Detection of *Micobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1995; 43:227-240.
- ✓ WARREN JR, BHATTACHARYA M, DE ALMEIDA KN, TRAKAS K and PETERSON Ir. A minimum 5.0 mL of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5): 1559-62.
- ✓ WHO World Health Organization: surveillance, planning, financing. WHO report 1997 Ginebra: World Health Organization..

- ✓ WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report, 2004 Ginebra: World Health Organization.
- ✓ WHO: Surveillance, planning, financing. WHO report 2008.. WHO/HTM/TB/2008.393.
- ✓ ZHRANI. Accuracy and Utility of Commercially Available Amplification and Serologic Tests for the Diagnosis of Minimal Pulmonary Tuberculosis. Am J resp and crit care of med 2000; 162.
- ✓ ZAINUDDIN ZF, DALE JW. Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. J. Gen. Microbiol. 1989; 135:2347-2355.
- ✓ ZAMIRIAN, Mahmood., MOKHTARIAN, Mehdi., MOTAZEDIAN, Mohammad., MONABATI, Ahmad., and REZAIAN, Gholam. Constrictive pericarditis: Detection of mycobacterium TB in paraffin-embedded pericardial tissues by polymerase chain reaction. Clinical Biochemistry 2007; Vol. 40 355–358.

9. ANEXOS



Universidad
del Cauca

Facultad Ciencias de la Salud
Departamento de Patología
Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular
Grupo de Investigación de Inmunología
y Enfermedades Infecciosas

Formulario N° _____

Nombre: _____ H.C. _____

Edad: _____ Procedencia: _____
Ciudad, Vereda, Municipio

Ocupación: _____ EPS: _____

Estado Civil: Casado Soltero Viudo Union Libre Sin Dato

Patrón Racial: Mestizo Negro Blanco Indígena Sin Dato

Estado Nutricional: Desnutrido Obeso Normal Sin Dato

Fecha de Ingreso: _____ Servicio y Cama: _____
Dato de Enfermería

Fecha de Traslado: _____ Servicio y Cama: _____
Dato de Enfermería

Fecha de Traslado: _____ Servicio y Cama: _____
Dato de Enfermería

Antecedente de Contacto con Tosedor: SI NO Sin Dato Fecha _____

Antecedente Personal de Tuberculosis: SI NO Sin Dato Fecha _____

Hospitalizaciones Previas: _____
Fecha Ingreso y Egreso *Servicio y Cama:*

Hospitalizaciones Previas: _____
Fecha Ingreso y Egreso *Servicio y Cama:*

Hospitalizaciones Previas: _____
Fecha Ingreso y Egreso *Servicio y Cama:*

Fecha de Diagnóstico: _____
Fecha de realizado el examen diagnóstico

BCG: SI NO Sin Dato

Anticuerpos a VIH SI NO Sin Dato

Fecha de Inicio de los Síntomas: _____

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Fiebre | <input type="checkbox"/> Focalización Neurológica |
| <input type="checkbox"/> Tos | <input type="checkbox"/> Hematuria |
| <input type="checkbox"/> Expectोरación | <input type="checkbox"/> Disuria |
| <input type="checkbox"/> Hemoptisis | <input type="checkbox"/> Polaquiuria |
| <input type="checkbox"/> Sudoración | <input type="checkbox"/> Dolor Abdominal |
| <input type="checkbox"/> Pérdida de Peso | <input type="checkbox"/> Ascitis |
| <input type="checkbox"/> Escalofrío | <input type="checkbox"/> Hepatomegalia |
| <input type="checkbox"/> Dolor Torácico | <input type="checkbox"/> Esplenomegalia |
| <input type="checkbox"/> Cefalea | <input type="checkbox"/> Anemia |
| <input type="checkbox"/> Trastorno de Conciencia | <input type="checkbox"/> Diarrea |
| <input type="checkbox"/> Pares Craneales | <input type="checkbox"/> Estreñimiento |
| <input type="checkbox"/> Artritis | <input type="checkbox"/> Adenopatias |
| <input type="checkbox"/> Amenorrea | |

Otros _____
Cuales

Rx de Torax: _____
Fecha *Descripción:*

Otros Rx: _____
Fecha *Descripción:*

Otros Rx: _____
Fecha *Descripción:*

Otros Rx: _____
Fecha *Descripción:*

Basiloscopias:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Basiloscopias:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Basiloscopias:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Basiloscopias:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Cultivo de Mycobacteria:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Cultivo de Mycobacteria:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Cultivo de Mycobacteria:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Cultivo de Mycobacteria:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Cultivo de Mycobacteria:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Cultivo de Mycobacteria:	<u>Fecha y Muestra</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Resultado</u>
Biopsia N°	<u>Fecha y Órgano</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Descripción</u>
Biopsia N°	<u>Fecha y Órgano</u>	<u>Laboratorio</u>	<u>Descripción</u>

PCR N° _____
Fecha y Muestra _____ *Resultado* _____

PCR N° _____
Fecha y Muestra _____ *Resultado* _____

Orina _____ *Fecha* _____ L.C.R. _____ *Fecha* _____

PH _____
Leucitos _____
Eritrocitos _____
Proteinuria _____
Bacterias _____

Leucitos _____
Eritrocitos _____
Proteínas _____
Glucosa _____

L. Pleural _____
Fecha _____

P.F.H. _____
Fecha _____

PH _____
Leucitos _____
Glucosa _____
Proteínas _____
ADA _____

TGO _____
TGP _____
FA _____
BD _____
BT _____

Fecha de Egreso: _____ *Data de Enfermería* Lugar donde se Envio _____

Controles: _____ *Fecha* Evolución: _____ *Clinica y Laboratorio*

Controles: _____ *Fecha* Evolución: _____ *Clinica y Laboratorio*

Fallecido: _____ *Fecha* Autopsia: _____ *Resultado*

Otros Diagnósticos:
