



Diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar mediante la reacción en cadena de la polimerasa

REVOLLO ZEPITA, SUSANA¹

TABORGA MANRIQUE, XIMENA¹

Resumen

La Tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa prevalente en todos los países del mundo pero que ha sido catalogada como una de las "Enfermedades de la Pobreza" por ser este el sector más afectado. Son susceptibles a esta enfermedad tanto hombres como mujeres de toda edad, pero suele causar mayores complicaciones en inmunodeprimidos. Aunque la forma pulmonar es la más frecuente, puede afectar cualquier órgano o tejido, dificultando el diagnóstico laboratorial. El Instituto Servicio de Laboratorios de Diagnóstico e Investigación en Salud, SELADIS, a través del Laboratorio de Biología Molecular, realiza el diagnóstico de la Tuberculosis, principalmente extrapulmonar, a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR anidado). Para la elaboración de este trabajo se ha compilado los datos y los resultados de 3771 pacientes que acudieron al laboratorio entre enero del 2008 y mayo del 2013. Se encontró un mayor número de casos positivos en el grupo de los varones. Considerando la edad los grupos etáreos más afecta-

Abstract

Tuberculosis is a contagious infectious disease prevalent in all countries of the world but it has been listed as one of the "Disease of Poverty" as this is the sector most affected. They are susceptible to this disease both men and women of all ages, but usually causes further complications in immunocompromised. Although the form in lung, is the most common, Tuberculosis can affect any organ or tissue, it difficult laboratory diagnosis. The Institute Diagnostic Laboratory Service and Health Research, SELADIS through Molecular Biology Laboratory, make diagnosis of tuberculosis, especially extrapulmonary through Polimerasa Chain Reaction (PCR nested). In order to do this work we compiled data and results of 3771 patients who attended the laboratory between January 2008 and May 2013. We found a higher number of positive cases in the group of men. Considering the age groups most affected are over 80 years old and 51-60 group. Most of the samples

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Instituto SELADIS, Fac. Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas - UMSA

dos son los mayores de 80 años y de 51 a 60. La mayor parte de las muestras fue sangre, pero el porcentaje más alto de resultados positivos se encontró en líquido pleural y líquido ascítico. En repetidas ocasiones se procesó dos muestras diferentes del mismo paciente, por ejemplo sangre y orina, pero pocas veces se halló un resultado positivo en ambas muestras. Por otro lado, el grupo en el que se encontró menor porcentaje de casos positivos fue el grupo de mujeres de 31 a 40 años; y la sangre fue el tipo de muestra en la que se obtuvo menos casos positivos.

were blood, but the highest percentage of positive results found in ascites and pleural liquid. Repeatedly processed two different samples from the same patient, such as blood and urine, but rarely found positive in both samples. On the other hand, the group in which there was lower percentage of positive cases was women 31-40 years old group, and the blood was the type of sample with less positive cases.

PALABRAS CLAVE

PCR anidado, Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*

KEY WORDS

nested PCR, Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*

INTRODUCCIÓN

A pesar de todos los esfuerzos que se vienen realizando y todos los logros que se han alcanzado, la Tuberculosis sigue siendo uno de los flagelos de los países pobres y de los sectores pobres dentro de los países que no lo son. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que 8,7 millones de personas enfermaron con Tuberculosis el año 2011 y 1,4 millones murieron; 95% de estas muertes se produjeron en países con bajos y medianos recursos. También estableció que aproximadamente un tercio de la población mundial es portadora del *Mycobacterium tuberculosis* (WHO, 2012; Bermejo, 2007, 7-19; Montes, 2008, 38-42; Raviglione, 1995, 220-226)

En Latinoamérica, Bolivia es uno de los países con incidencia más elevada: más de 85 infectados por 100.000 habitantes, ocupa el segundo lugar después de Haití en las Américas (WHO, 2012; Min. Salud y Dep., 2009, 11)

La Tuberculosis extrapulmonar se produce entre el 10 y el 20% de los casos de Tuberculosis pulmonar, pero puede aumentar considerablemente cuando la persona también padece otras enfermedades como el SIDA (Moran, 2001, 33-51; Fanlo, 2007, 143-162)

El *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo responsable de este mal, después del primer contacto, puede diseminarse por contigüidad, por vía hemática, o vía linfática hacia cualquier órgano. La posibilidad de que produzca una Tuberculosis secundaria depende de la virulencia de la cepa, desnutrición del paciente, sistema inmune, vía de transmisión y otros factores (Moran, 2001, 33-51; Fanlo, 2007, 143-162)

El diagnóstico de la enfermedad está basado en la observación directa del microorganismo, convenientemente teñido, tinción Zielh Neelsen; el cultivo del microorganismo en medios adecuados, o el diagnóstico indirecto basado en la determinación de la respuesta inmune del paciente ante la presencia del microorganismo (Nolte, 2009, 400-437). Una técnica alternativa es, sin duda, la detección del material genético del microorganismo a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa que reproduce un segmento de nucleótidos del

DNA tantas veces que se lo puede observar a simple vista, con ayuda de luz ultravioleta. Esta técnica es reconocida por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez frente a las pruebas clásicas (Noris, 2009, 4-6)

El instituto SELADIS, realiza desde el año 2000, el diagnóstico de Tuberculosis extrapulmonar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, NESTED PCR.

El Nested PCR utiliza dos pares de cebadores, el primer par amplifica la secuencia IS6110 que es específica del *Mycobacterium tuberculosis* y se repite varias veces (hasta 20) en su genoma. El segundo par, amplifica un segundo segmento de nucleótidos en la región amplificada por el primer par (Gillespie, 1997, 799).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es dar a conocer los resultados obtenidos a través del diagnóstico molecular de la Tuberculosis en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto SELADIS desde enero de 2008 hasta mayo de 2013, así como la distribución de los mismos de acuerdo al sexo, edad y tipo de muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 3771 muestras que llegaron al Instituto SELADIS entre enero de 2008 y mayo de 2013. Las muestras corresponden a individuos de toda edad, de ambos sexos. Se analizaron muestras de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, líquido peritoneal, líquido pericárdico, lesión cutánea, secreción purulenta, líquido seminal, lesión genital, líquido intestinal purulento, drenaje de fístula, líquido seminal, secreción bronquial y heces. La mayoría de los sujetos de estudio fueron personas con cuadros clínicos que requerían la determinación laboratorial de la presencia del microorganismo; pero también solicitaron diagnóstico por PCR, personas que necesitaban descartar la presencia significativa del *mycobacterium*, por ejemplo para realizar trasplante de órganos o como requisito para postular a una beca.

Para la extracción del ADN se calentó a 95°C durante 15 minutos, 1 ml de la muestra con 200 µl de solución G1 (Hidróxido de sodio y N-acetilcisteína). Se lavó dos veces con 500 µl de Tris-HCl y el material nuclear se purificó con 25µl de fenol (en caso de que la muestra fuera sangre) y dos lavados con cloroformo en un volumen similar al que contiene ADN.

Para amplificar el ADN, se utilizó la técnica Nested PCR a través de la cual se realiza dos amplificaciones consecutivas del fragmento de inserción IS6110 que se repite varias veces, hasta 20, en el genoma del *Mycobacterium tuberculosis*.

Para realizar esta amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reactivos: buffer 10 X (Tris, KCl), nucleótidos (5 mM), cuatro primers (1 µM c/u), cloruro de magnesio (25 mM), DNA polimerasa (5 U/µL), DMSO (como estabilizador) y agua tridestilada libre de nucleasas.

Para observar el producto de la amplificación se realizó electroforesis, durante 25 minutos, en gel de agarosa al 1,5% con Sybr Green (0,002%) como agente intercalante del ADN.

Con el propósito de asegurar los resultados, se utilizó los siguientes controles:

- Control del agua utilizada para la preparación de la mezcla para la amplificación de ADN

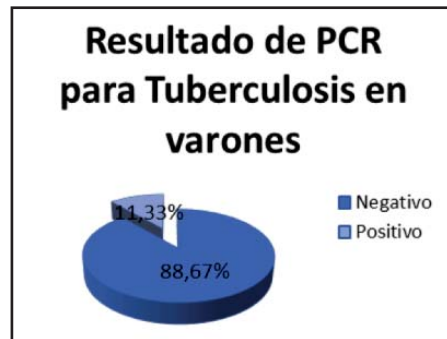
- Control del agua utilizada para el proceso de extracción de ADN
- Control positivo, procedente de un cultivo del Mycobacterium tuberculosis
- Control negativo, procedente de un cultivo de otra especie (Leishmania)
- Un control de “inhibición” para cada muestra, que tienen como objetivo verificar que la extracción del ADN de la muestra no incluya contaminantes que pueden inhibir la amplificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Resultados según sexo

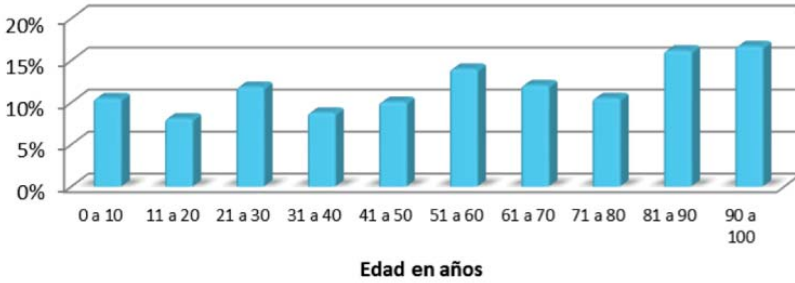
Se analizaron 1820 muestras de mujeres, de las cuales 191 resultaron positivas y 1629 negativas. 1951 muestras analizadas corresponden a varones, de estas 221 fueron positivas y 1730 negativas.



En el sexo femenino el porcentaje de casos positivos (10,49%) es un poco menor en relación al masculino (11,33%). Este resultado coincide con el reportado por el Programa Nacional de Lucha Contra la Tuberculosis durante las gestiones 2006 y 2007 (Min. Salud y Dep., 2009, 11)

Resultados de acuerdo a la edad

Resultado positivo de PCR para diagnóstico de Tuberculosis por edad

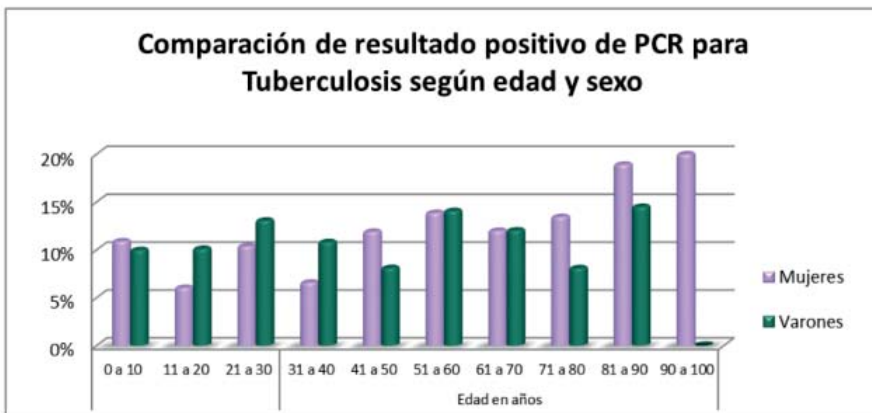


RESULTADO DE PCR PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS POR EDAD

		Edad en años									
		0 a 10	11 a 20	21 a 30	31 a 40	41 a 50	51 a 60	61 a 70	71 a 80	81 a 90	90 a 100
Positivo		10	38	87	48	48	70	48	28	16	1
Negativo		86	412	606	481	402	384	353	215	70	5

Los grupos de edad con más resultados positivos son de 81 a 90 y de 91 a 100, pero también son los grupos que tienen menos cantidad de individuos analizados (70 y 5 respectivamente), aun así, este resultado puede ser justificado considerando las características propias de la edad. Los siguientes grupos con más resultados positivos son: de 51 a 60 años y de 21 a 30 años. Según el Plan Estratégico para el Control de la Tuberculosis en Bolivia, los grupos etáreos con mayor incidencia de Tuberculosis en Bolivia son de 15 a 24 años y por encima de 55 (Min. Salud y Dep., 2009, 11).

Resultados por edad y sexo



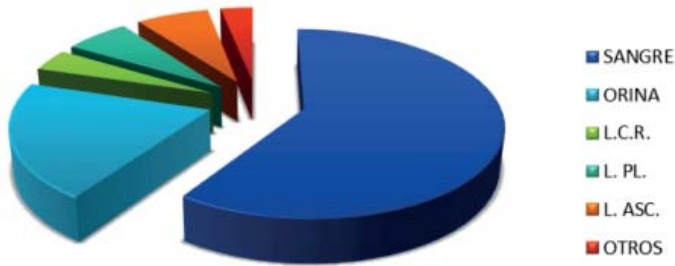
Comparación de resultado positivo de PCR para Tuberculosis según edad y sexo

		Edad en años									
		0 a 10	11 a 20	21 a 30	31 a 40	41 a 50	51 a 60	61 a 70	71 a 80	81 a 90	90 a 100
Mujeres		10,91%	6,05%	10,40%	6,60%	11,90%	13,88%	12,00%	13,45%	18,92%	20,00%
Varones		10,00%	10,12%	13,07%	10,82%	8,13%	14,07%	12,05%	8,11%	14,52%	0,00%

De acuerdo a los resultados obtenidos la Tuberculosis se distribuye en ambos sexos. Exceptuando el grupo de 90 a 100 años en el que se analizó solo 5 muestras, el cuadro muestra los porcentajes más altos para mujeres en los grupos de 81 a 90 y de 51 a 60 años. En estos mismos grupos etáreos se ha encontrado también mayor cantidad de resultados positivos en varones.

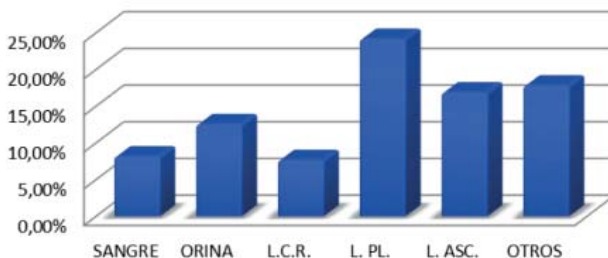
RESULTADOS POR TIPO DE MUESTRA

Tipo de muestras analizadas para diagnóstico de Tuberculosis por PCR



En esta gráfica se puede observar los tipos de muestra que llegaron con más frecuencia al laboratorio de Biología Molecular. Se analizaron 2246 muestras de sangre, 759 muestras de orina, 145 muestras de líquido cefalorraquídeo, 236 muestras de líquido pleural, 267 muestras de líquido ascítico y 118 muestras de diferente origen (otros) las cuales son analizadas posteriormente.

Comparación de resultado positivo para Tuberculosis por PCR entre tipos de muestra



Uno de los valores más bajos fue en sangre (8,53%). La principal causa probablemente se debe a que los bacilos suelen estar localizados en un tejido en particular y la concentración a nivel hemático es baja y por consiguiente poco probable de detectar incluso por PCR. Por otro lado muchos usuarios solicitan PCR en sangre solo para cumplir un requisito, por ejemplo para beca.

La tuberculosis renal y de vías urinarias es secundaria a una infección pulmonar. El microorganismo se traslada por vía hematológica hasta uno o ambos riñones donde puede permanecer inactivo, incluso por algunos años o producir lesiones inmediatamente (Neda, 2006). Se ha reportado que suele presentarse sobre todo en varones jóvenes y representa aproximadamente un décimo de los casos de Tuberculosis extrapulmonar (Fanlo, 2007, 143-162). En el presente trabajo se encontró en 12,56% de los casos, un poco superior al reporte mencionado.

El PCR en líquido cefalorraquídeo ha mostrado una sensibilidad variable, por ejemplo Laboratorios Roche informó un 60% de sensibilidad en casos clasificados como tuberculosis definitiva o probable (Lasso, 2011, 238-247). En el presente estudio se reporta 7.65%, uno de los resultados más bajos.

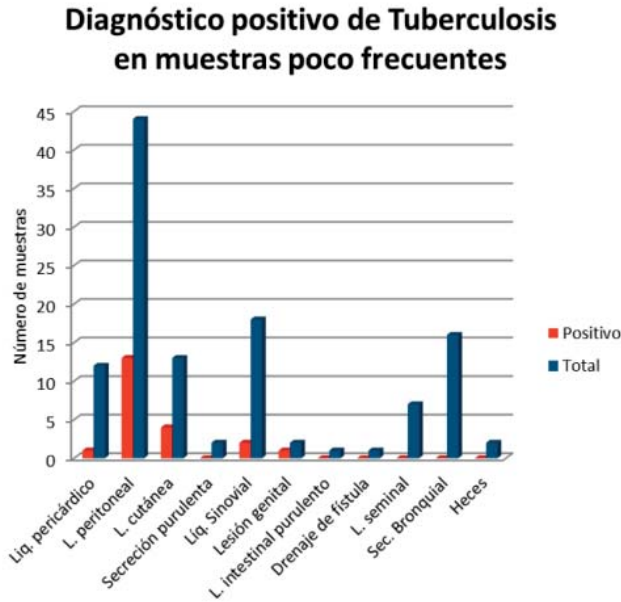
La importancia de la meningitis tuberculosa radica en la alta tasa de mortalidad y las secuelas que puede ocasionar cuando el paciente no fallece. Las formas clínicas más frecuentes son: meningitis tuberculosa, tuberculoma intracraneal, aracnoiditis meningo espinal. Según Fanlo, representa el 5% de los casos de Tuberculosis extrapulmonar y se presenta sobre todo en niños y en enfermos con VIH (Fanlo, 2007, 143-162)

Según el cuadro, el resultado positivo más alto corresponde al realizado en líquido pleural (24,15%) este resultado es justificable considerando la proximidad de las pleuras con los pulmones y, por tanto, la continuidad de tejido en el caso de una tuberculosis pulmonar. La tuberculosis pleural es la causa más frecuente de derrame pleural, suele ser más frecuente en niños, adolescentes y jóvenes (Fanlo, 2007, 143-162).

La peritonitis tuberculosa es una forma poco frecuente de tuberculosis extrapulmonar, se presenta principalmente en pacientes cirróticos o inmunodeprimidos. En el 90% de los casos produce ascitis (Huamán-López, 2002, 1). En este trabajo reportamos 16,85% de casos positivos en líquido ascítico y 29,54% en líquido peritoneal (ver el cuadro siguiente)

Casi en todas las muestras procedentes de un tejido en particular se encontró un resultado positivo superior al encontrado en la sangre.

Resultados en muestras poco frecuentes



La pericarditis tuberculosa se presenta entre el 1 y 2% de pacientes que sufren de tuberculosis pulmonar (Fanlo, 2007, 143-162). En el laboratorio se analizó sólo 12 muestras de líquido pericárdico, de las cuales 1 resultó positiva.

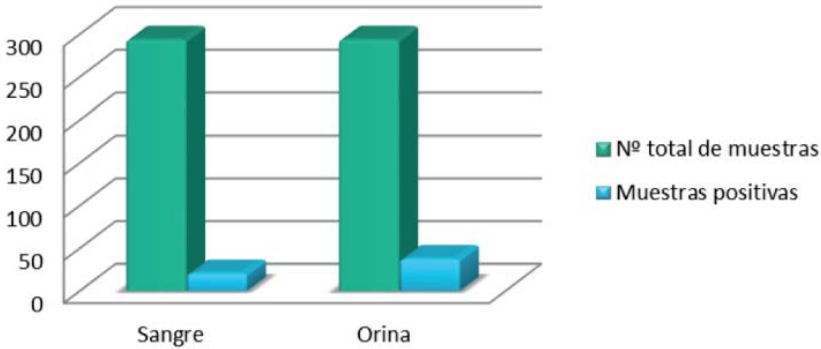
La tuberculosis cutánea representa el 1% de los casos de tuberculosis extrapulmonar, se presenta con mayor frecuencia en niños menores de 10 años (Fanlo, 2007, 143-162). Fueron sólo 13 las muestras analizadas en el laboratorio, pero el 30,67% resultó positivo, alrededor del 1% de todos los positivos de este estudio

Se hallaron 2 resultados positivos en 18 analizados en líquido sinovial y 1 positivo de 2 muestras analizadas en lesión genital. El resto de las muestras analizadas dieron todas negativas.

Resultados en más de una muestra procesada por paciente

Para 320 pacientes se solicitó al laboratorio la realización de PCR para diagnóstico de Tuberculosis en dos o tres muestras diferentes del mismo paciente. 294 eran muestras de sangre y orina (588 muestras en total), 43 de las cuales resultaron positivas en una de las dos muestras: 13 sólo en sangre y 30 sólo en orina y solamente en 8 pacientes se obtuvo resultado positivo en ambas muestras. Otros estudios reportan un incremento del 10% en la sensibilidad del método cuando se trabaja con dos muestras del mismo paciente (Norris, 2009, 4-6; Ahmed, 1998, 3094-95).

Comparación de resultados en muestras del mismo paciente



En un caso se procesó una muestra de orina y otra de lesión genital del mismo paciente, en este caso, ambas muestras resultaron positivas.

15 veces se solicitó la realización de pruebas con otras combinaciones de muestras, por ejemplo, sangre y líquido pleural, orina y líquido seminal, líquido pleural y líquido ascítico y otros; en todos estos casos el resultado fue negativo con ambas muestras.

CONCLUSIONES

La tuberculosis extrapulmonar suele ser muy difícil de diagnosticar por baciloscopia por la escasez de bacilos que se pueden aislar de las muestras, en estos casos el diagnóstico mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa se constituye en una buena alternativa.

Ante la sospecha de una tuberculosis extrapulmonar, lo ideal es realizar el diagnóstico en el líquido o tejido comprometido. La posibilidad de detectar en sangre al bacilo, cuando este está localizado en una zona del cuerpo, es menor.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio se asemejan a los reportados por otros autores.

Se encontró mayor porcentaje de casos positivos en varones que en mujeres; pero no hay una distribución agrupada considerable de acuerdo a la edad.

El tipo de muestra en el que se encontró mayor porcentaje de resultado positivo fue en líquido pleural.

Debido al aumento en la sensibilidad, en caso de sospecha de Tuberculosis en un tejido en particular debería preferirse el análisis en una muestra procedente de tal tejido en lugar de muestra sanguínea o, por ejemplo orina en caso de una Tuberculosis renal. Si es posible, debería realizarse el análisis en ambas muestras.

Debido al escaso volumen de muestra que se utiliza, un resultado negativo por PCR no descarta la presencia de la bacteria en el paciente.

REFERENCIAS

- Organización Mundial de la Salud. (2012). Tuberculosis Datos y Cifras. Recuperado de www.who.int/tb/publications/global_report/es/
- Bermejo, M.C., Clavera, I., Michel de la Rosa, F.J. & Marín, B., (2007) Epidemiología de la tuberculosis, *Anales Sistema Sanitario. Navarra* 30(2) pp. 7-19
- Montes, N.H. (2008) Tuberculosis. *Revista Paceaña de Medicina Familiar.* 5(7). Pp. 38-42
- Raviglione, M. C., Snider Jr, D. E., & Kochi, A. (1995). Global epidemiology of tuberculosis. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 273(3), 220-226.
- Ministerio de Salud y Deportes. (2009). Plan Estratégico para el Control de la Tuberculosis en Bolivia 2008 -2015 (80), pag. 11.
- Moran, E., Lazo Y. (2001) Tuberculosis. *Rev Cubana Estomatol* 38(1) pp. 33-51.
- Fanlo, P., & Tiberio, G. (2007). Tuberculosis extrapulmonar. *Anales Sistema Sanitario. Navarra*, 30(2). pp. 143-162.
- Nolte, F.S. & Metchock, B. (2009) *Mycobacterium*. En P.R. Murray. (6th), *Manual of Clinical Microbiology*. (pp 400-437). Washington: American Society for Microbiology.
- Noris, G. & Santana, C. (2009) Detección molecular de Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Biología Molecular Diagnóstica*. Pp. 4-6
- Gillespie, S. H., McHugh, T. D., & Newport, L. E. (1997). Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of clinical microbiology*, 35(3), 799.
- Neda, A., (2006) Tuberculosis urogenital. Recuperado de tuberculosisurogenital.blogspot.com
- Lasso B, M. (2011). Meningitis tuberculosa: claves para su diagnóstico y propuestas terapéuticas. *Revista chilena de infectología*, 28(3), 238-247.
- Huamán-López, N. (2002). Tuberculosis intestinal y peritoneal. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 15(1).
- Ahmed N., Mohantly A.K., Mukhopadhyay U., Batish V.K., Grover S. (1998) *J Clin Microbiol.* 36(10). Pp. 3094-95.