

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA

EVALUACION DE METODOS PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS RENAL

POSTULANTE: Rocio Claribel Lopez Cardenas

Tesina para optar al Titulo de Licenciatura en Bioquímica

LA PAZ – BOLIVIA

2006

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA



EVALUACION DE METODOS PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS RENAL

POSTULANTE: Rocio Claribel Lopez Cardenas

ASESORA: Dra. Susana Revollo, Ph.D.

LA PAZ – BOLIVIA

2006

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra Susana Revollo
por su paciencia , sabiduría y
a la Dra Claudia Paredes por
brindarme su constante apoyo.

DEDICATORIA

A mi familia, amigos y docentes
por creer en mi como yo creo en
Jesús de Nazareth

Resumen

La utilidad de la baciloscopia, cultivo y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) fue evaluada en 31 muestras de orina, provenientes de pacientes de ambos sexos, sin distinción de grupo étnico y edades comprendidas entre los 5 y 80 años, con presunto diagnóstico de tuberculosis renal. A todas las muestras, se les practicó baciloscopia utilizando la técnica de coloración de Ziehl-Neelsen. Se utilizó el medio de cultivo Lowenstein –Jenssen como estándar. Los objetivos para el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) fueron los genes que codifican la proteína de 32-KDa. y la secuencia de inserción IS6110. Luego de la amplificación, se obtuvo un fragmento de 984 pares de bases correspondiente a la secuencia de inserción IS6110 y otro de 506 pares, correspondiente al antígeno alfa 32 -KDa. Del total de muestras examinadas por el método de Ziehl-Neelsen, 13 resultaron positivas y 18 resultaron negativas (41,9 y 58,11% respectivamente). De las 31 muestras sembradas 26 (83,9%) resultaron positivas y 5 (16,1%) fueron negativas al cultivo. De todas las muestras amplificadas, 27 (87,09%) mostraron la presencia de fragmentos de ADN correspondientes tanto a la secuencia de inserción IS6110, como al antígeno alfa 32 KDa., mientras que en 4 (12,9%) no se detectó la presencia de ADN micobacteriano por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). La sensibilidad de la prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) fue virtualmente de 100% y su especificidad fue del 80%. Se demostró que Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), basado en la amplificación simultánea del elemento de inserción IS6110 y del gen que codifica el antígeno alfa en un solo paso, puede identificar infecciones por micobacterias a partir de muestras de orina. Se concluye que esta técnica es más sensible que los procedimientos bacteriológicos de rutina (examen directo y cultivo) y la convierten en una herramienta muy útil para el diagnóstico de tuberculosis renal y otras enfermedades micobacterianas.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
II. JUSTIFICACION.....	3
III. DISEÑO TEORICO.....	5
MARCO REFERENCIAL.....	5
1. ANTECEDENTES GENERALES.....	5
a. EPIDEMIOLOGIA.....	5
b. GRUPO DE RIESGO.....	7
c. CONCEPTO DE TUBERCULOSIS RENAL.....	8
d. ETIOLOGIA.....	8
e. PATOGENIA.....	9
f. MORFOLOGIA PATOLOGICA.....	11
g. PREVENCION.....	13
h. CRITERIOS DE EFICACIA.....	14
2. DESCRIPCION DE LA POBLACION EN ESTUDIO.....	15
3. DESCRIPCION DEL AMBIENTE DE TRABAJO.....	15
IV. OBJETIVOS.....	16
1. OBJETIVO GENERAL.....	16
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16
V. DISEÑO METODOLOGICO.....	17
1. ESQUEMA DEL PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	17
2. POBLACION EN ESTUDIO.....	18
3. MUESTRAS.....	18
a RECEPCION Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS.....	18
b MUESTRAS CONTAMINADAS.....	18
c TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PREVIO AL CULTIVO.....	
VI. TECNICAS DE INVESTIGACION.....	18
1. INVESTIGACION DE LABORATORIO.....	18
2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CONTAMINADAS.....	19
3. BACILOSCOPIA.....	19
4. CULTIVO DE LAS MUESTRAS.....	21
a. MEDIO DE LOWESTEIN – JENSEN.....	21

b. LECTURA DE LOS CULTIVOS.....	21
c. INFORME DE RESULTADOS DE CULTIVO	22
5. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	22
VII. RESULTADOS.....	24
VIII. DISCUSIONES.....	31
IX. CONCLUSIONES.....	35
X. RECOMENDACIONES.....	36
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	37

INTRODUCCION.-

En Bolivia, esta enfermedad se ha convertido en un problema nacional debido a la política de abandono interno, el desempleo y la pobreza extrema que ha terminado por afectar al 60% de la población aproximadamente; donde 13 millones de bolivianos no pueden satisfacer sus necesidades básicas dando lugar a que la tuberculosis se transforme en problema nacional. (1)

Los casos reportados en nuestro país en 1989 de 176 por 100 000 habitantes, desciende a 129 por 100 000 habitantes, entre 1990 y 1995, hasta el año 2001 de 127 por 100 000 habitantes, en 2002 a 124 por 100 000 habitantes. Siendo la mayor tasa de incidencia en el departamento de Santa Cruz seguido por Tarija, La Paz, Cochabamba, Beni, Chuquisaca, El Alto, Pando, Potosí y Oruro, sin embargo Santa Cruz tiene y cumple un buen programa de la tuberculosis, el cual les permitió disminuir la incidencia y morbilidad. Pero La Paz tiene una deficiencia en el cumplimiento del Programa de tuberculosis. La incidencia de casos nuevos de tuberculosis notificados por año; el 80% es pulmonar, el 10% es infantil y el 10% es extrapulmonar, de los cuales el 9.8% es renal. (1)

La tuberculosis **renal** es la forma más tardía de presentación y suele aparecer al cabo de 20-30 años de la primoinfección. El paciente suele referir sólo molestias locales, disuria, polaquiuria y urgencia vesical. La tuberculosis renal es una enfermedad grave, de evolución crónica, que puede llegar a ser fatal si no se diagnostica y se trata oportuna y adecuadamente. Si esto no ocurre puede llegar a insuficiencia renal, uremia y muerte del paciente. (3)

Por esta **razón** el diagnóstico de Laboratorio de la tuberculosis es de mayor importancia, se refiere al hallazgo del bacilo de Koch.

En el presente trabajo se emplea baciloscopia, la cual es considerar el examen básico para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Sin embargo esta técnica

tiene sus limitaciones en cuanto se refiere al diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar, lo cual es justificable si se toma en consideración la patogenicidad y biología del bacilo. Para que el diagnóstico por microscopía directa sea positivo es preciso que la muestra de orina contenga entre 5 000 y 10 000 bacilos de la tuberculosis por mililitro de orina. También es prácticamente imposible distinguir entre las diferentes especies micobacterianas utilizando la microscopía. Los pacientes cuyos frotis son positivos son portadores del mayor número de bacilos de la tuberculosis, son los más infecciosos y por consiguiente, es de suma importancia detectarlos en forma temprana porque son los responsables de la propagación de la enfermedad.

El Cultivo bacteriológico y la Reacción en Cadena de la Polimerasa estos permite realizar un diagnóstico definitivo de la tuberculosis renal, el tipo de medio de Cultivo utilizado es el Medio de Lowenstein Jensen, en el que pueden detectarse hasta un mínimo de diez bacilos de la tuberculosis viable. Como las técnicas de Cultivo permiten detectar un número reducido de bacilos, puede aumentarse considerablemente la eficiencia en el diagnóstico de los fracasos al finalizar el tratamiento. Los métodos de Cultivo también producen el material necesario para las pruebas de sensibilidad a los medicamentos. Sin embargo, el Cultivo de las muestras es mucho más caro que la microscopía.

Mientras que la Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, es una técnica (descrita en 1985, por Kary Mullis) de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un copias de un fragmento de ADN, partiendo de un mínimo, en teoría, de una única copia de ese fragmento. Esta técnica sirve para amplificar el ADN. Tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que convierta en una técnica muy extendida.

II. JUSTIFICACION.

Dentro de las estrategias para combatir la tuberculosis, el diagnóstico es uno de los pilares más importantes, debido a que permite la atención e inicio del tratamiento y en consecuencia minimiza los riesgos de contagio y dispersión de la enfermedad.

En nuestro [país](#) existe una elevada tasa de incidencia. En el año 2001 se tenía una incidencia de 127 por 100 000 habitantes y 124 por 100 000 habitantes en el año 2002.

En el presente trabajo se tomara en cuenta las siguientes técnicas baciloscopia, cultivo y la reacción encadena de la [polimerasa](#).

La baciloscopia, a través del examen directo de la muestra y coloración con la técnica de Ziehl-Neelsen, no es 100% confiable, pues el bacilo no siempre es detectado en las muestras clínicas examinadas. La sensibilidad deja mucho que desear, varía dependiendo del tipo de muestra y la micobacteria involucrada, ya que como regla deben existir entre cinco mil a diez mil bacilos por ml. para que tengan un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio. Además la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en el examen directo de muestras clínicas, no siempre garantiza que se trate de un bacilo tuberculoso, pues puede tratarse de una micobacteria atípica o de otro microorganismo que comparta la característica de ácido alcohol resistencia (*M. leprae*, *Actinomyces*, *Nocardia*). Esto puede ocasionar graves problemas en el diagnóstico. El rango de sensibilidad de la baciloscopia, oscila entre 50 – 80% y la especificidad es virtualmente del 100% (3).

El cultivo, es una técnica que tiene mayor sensibilidad (70 -90%), ya que basta que existan más de 10 bacilos/ ml. Los métodos de identificación convencionales después del cultivo incluyen determinación de la velocidad de crecimiento, morfología de la colonia, producción de pigmentos y susceptibilidad a los agentes.

De tal manera que en casos en los que se requiera una toma de decisiones rápidas para instaurar una terapéutica efectiva su valor es muy limitado (3).

Por lo tanto, las técnicas bacteriológicas tradicionales de laboratorio (baciloscopia y cultivo), a pesar que tienen una buena sensibilidad y especificidad, no son lo suficientemente útiles cuando se requiere de un diagnóstico precoz y específico (formas extrapulmonares, primoinfección tuberculosa en niños, formas cerradas, infección micobacteriana en pacientes VIH).

La amplificación de ácidos nucleicos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica muy útil para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, pues permite un diagnóstico rápido, sensible y específico, a través de la identificación del ADN o ARN presente en las muestras clínicas, pudiendo despejar los problemas derivados de los procedimientos habituales de laboratorio (3)

Los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa al igual que los de la microscopía, pueden ser obtenidos 24 horas después de recibir la muestra. La especificidad y sensibilidad excede a la de la microscopía. Estudios han reportado sensibilidades entre 74-91% y especificidades entre 95-100% (3).

Es muy importante tener en cuenta que el diagnóstico de tuberculosis por medio de la amplificación de los ácidos nucleicos posee derivaciones adicionales importante que permiten determinar desde la especie de cepa de micobacteria infectante, hasta la resistencia a antibióticos; información importante para la implementación de nuevos tratamiento antimicobacterianos.

Por tales motivos decidimos realizar el presente trabajo sobre tuberculosis renal para comprobar la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y rapidez de los diferentes métodos de detección del *Mycobacterium tuberculosis*.

III. DISEÑO TEORICO

MARCO REFERENCIAL

1. ANTECEDENTES GENERALES

a. EPIDEMIOLOGIA

La tuberculosis es una enfermedad social de naturaleza infecto-contagiosa de evolución crónica y producida por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Generalmente afecta a los pulmones, pero puede expandirse a otros órganos del cuerpo, tales como el cerebro, riñones, espina dorsal, huesos, piel, etc. La tuberculosis renal es una infección oportunista que afecta en forma primaria a individuos de clase social más baja o aquellos que presentan compromiso del sistema inmune debido a la edad (niños o ancianos), infecciones (VIH) o al tratamiento con moduladores del sistema inmune (transplante de órgano). (5)

La tuberculosis es un problema de salud importante en las naciones industrializadas como también en los países en vía de desarrollo, por lo que merece analizar su situación epidemiológica actual para comprender correctamente esta enfermedad en su globalidad. (7)

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que en todo el mundo se producen 10 millones de nuevos casos de todas las formas de tuberculosis por año, sobre todo en países en vía de desarrollo afectando principalmente a adolescentes y a adultos jóvenes.

A nivel mundial la forma urinaria de la tuberculosis es responsable de sólo un 14% de todas las manifestaciones extrapulmonares y sólo un 20% de estos casos afectan a personas de raza blanca.

En Estados Unidos y en Inglaterra se ha documentado una incidencia de 13 cada 100.000 habitantes, en cambio en algunos países del Tercer Mundo la incidencia de Tuberculosis puede llegar hasta 400 cada 100.000 habitantes. (3)

Otro dato que reviste importancia urológica es el hecho de que en el mundo occidental sólo un 8 a un 10% de los pacientes con una tuberculosis pulmonar desarrollan una tuberculosis renal, mientras que en los países subdesarrollados, la proporción de personas con *Mycobacterium tuberculosis* en la orina puede llegar a 15-20%.

La incidencia de casos nuevos de tuberculosis notificados por año; el 80% es pulmonar, el 10% infantil y el 10% es extra-pulmonar de los cuales la tuberculosis urogenital es una de las principales por su mayor frecuencia.

La tuberculosis en Bolivia, sobre todo en regiones tropicales es una enfermedad transmisible endémica de gran severidad, constituyéndose un problema de salud publica los casos reportados en nuestro país en 1989 fue de 176 por 100 000 habitante descendiendo a 129 por 100 000 habitantes entre 1990 y 1995, hasta el año 2001 de 127 por 100 000 habitantes y en el 2002 a 124 por 100 000 habitantes. Siendo la mayor incidencia en el departamento de Santa Cruz (Norte cruceño) seguido por Tarija, La Paz (Yungas), Cochabamba (Chapare), Beni, Chuquisaca, El Alto, Pando, Potosí y Oruro. De los cuales Santa Cruz tiene y cumple mejor el Programa de la tuberculosis Nacional. La Paz tiene deficiencias con el cumplimiento del Programa de Tuberculosis. La tasa de incidencia notificada de la tuberculosis en todas sus formas hasta 1996 fue de 132 por 100 000 habitantes y la tasa de la incidencia de tuberculosis pulmonar confirma 92 por 100 000. (3)

En relación al sexo, desde hace más de una década, hay predominio en el caso del sexo masculino. Sin embargo, la notificación de casos en el sexo femenino aumento, 32% en 1989 y 39% en 1996 atribuido a la demanda de atención.

La tasa de incidencia notificada de la tuberculosis en todas sus formas en 1996 para el sexo masculino fue de 167 por 100 000 hombres y para el sexo femenino de 101 por 100 000 mujeres.

Geográficamente en 1996, el 71% de la notificación de la tuberculosis pulmonar confirmado corresponde a Santa Cruz, La Paz y Cochabamba.

En el departamento de Santa Cruz alcanzaron buenos resultados con la estrategia utilizada por el Programa de la tuberculosis. En 1990 el 40% de los pacientes estaban curados, cifra que aumento a un 87% en 2001.

En 1990 el 55% de los pacientes habría abandonado el tratamiento, disminuyen do esta cifra a un 7% el 2001.

En el departamento de La Paz; la tasa de incidencia notificada de tuberculosis en todas sus formas, por 100 000 habitantes disminuye de 191 en 1991 a 113 en 1995 y sube al 121 en 1996.

La tuberculosis confirmada también disminuye de 141 en 1991 a 79 en 1995 e incrementa a 82 por 100 000 habitantes en 1996. (1)

b. GRUPO DE RIESGO

Bolivia es zona con una prevalencia considerable por ello todos somos “grupo de riesgo”. Desde el punto de vista epidemiológico es importante c onocer las personas que pertenecen a los grupos de riesgo expuestas a estas enfermedades:

- Contacto estrecho con enfermos de tuberculosis.
- Emigrantes a de zonas de alta prevalencia.
- Adictos a drogas por vía parenteral
- Residentes en instituciones cerradas, especialmente población reclusa. Entre estas personas es cuatro veces más prevalente que entre los grupos de la misma edad no reclusa.
- Personas con expansión ocupacional: sanitarios, etc.

- Especial importancia epidemiológica tiene la prevalencia de infección e incidencia de enfermedad en la población infantil. Así cuando un niño presenta tuberculosis, indica que la infección ha sido transmitida recientemente, y que personas que lo transmitió puede ser todavía infectivo y que otros niños y adultos en la comunidad han sido expuestos.
- Los médicos de atención primaria son una de las fuentes más importantes para la detección y notificación de casos. Otras fuentes son los médicos de atención especializada, los laboratorios de microbiología, los servicios de anatomía patológica los registros de casos de SIDA, instituciones penitenciarias y todo personal capacitado. (2)

c. CONCEPTO DE TUBERCULOSIS RENAL

Se produce por diseminación sanguínea de la infección primaria. Habitualmente se desarrolla de 5 a 15 años más tarde después de la primera infección.

Comienza usualmente en la parte externa del riñón (corteza) avanza destruyendo el tejido renal y formando una cavidad. Si el material inflamatorio obstruye los uréteres, la presión retrograda puede provocar una destrucción difusa en el riñón o absceso renal: la infección se disemina hacia el uréter (que puede destruirse), y hacia la vejiga (donde puede formarse úlceras). Clínicamente el paciente puede presentar: disuria, hematuria y micción frecuente, dolor lumbar. Puede producirse absceso renal en casos avanzados.

d. ETIOLOGIA

La tuberculosis renal es producida por el *Mycobacterium tuberculosis* el cual es el más virulento e infectante de todas las micobacterias.

El *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo estrictamente aerobio y capaz de multiplicarse en los alvéolos pulmonares, prolifera en la superficie de un medio

enriquecido con huevo, se divide sólo una vez cada 20 a 24 horas. La mayor parte de los antibióticos sólo actúan mientras funcionan los mecanismos metabólicos de la bacteria, lo que implica que los microorganismos sólo son susceptibles a los fármacos cuando se encuentran en proceso de división.

Es resistente a los diversos mecanismos de destrucción intracelular en la fase temprana de la infección antes del desarrollo completo de la inmunidad celular. Puede sobrevivir a la fagocitosis e incluso movilizarse a través del citoplasma del fagocito.

Otro factor inherente es que pueden pasar a un estado latente y permanecer en los tejidos durante periodos prolongados.

Es mucho más propensa que la mayor parte de las otras bacterias al desarrollo de resistencia, sobre todo si se administra un solo antibiótico.

e. PATOGENIA

La tuberculosis renal siempre es secundaria a una afección pulmonar y puede ocurrir por:

Reactivación de infección antigua.

Reinfección a partir de un caso activo.

La vía de llegada del *Mycobacterium tuberculosis* es por diseminación sanguínea siendo **sitio predilecto** de las lesiones iniciales la zona de la **corteza renal**.

La infección primaria puede haber tenido lugar muchos años antes, contraída a través de la inhalación de las gotitas de secreciones bronquiales infectadas.

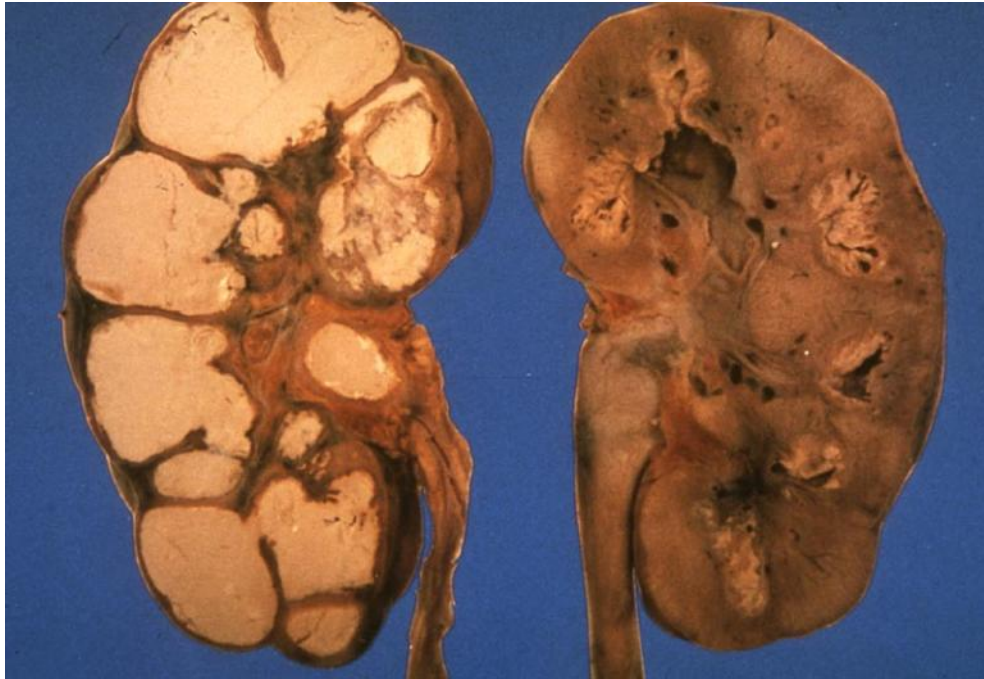
Una vez que una persona ha contraído la infección de *Mycobacterium tuberculosis* vivas puede alojarse en cualquier parte del cuerpo durante el resto de la vida de esa persona y provocar una reactivación tuberculosa si existen las condiciones apropiadas.

Los bacilos de Koch son atrapados en los capilares de los glomérulos, dando inicio a las primitivas lesiones y a la formación de tubérculos microscópicos en la corteza renal; éstas lesiones pueden quedar silentes por años evolucionando a la curación algunos casos y otros por hipersensibilidad huésped-tejido, disminución de las defensas con la edad o por una reinfección dar las siguientes formas de lesiones renales:

Lesión ulcerativa papilar o papilitis tuberculosa: la lesión se convierte en abierta y se comunica con las vías excretorias, apareciendo más fácilmente la baciluria, pudiendo diseminarse a todo el tracto urinario o genital.

Lesión cavitaria: Los tubérculos formados se rompen ingresando de esta manera los bacilos a los tubos y son atrapados en la parte más estrecha del Asa de Henle en la cual el material caseoso empieza a aparecer en la médula. Si éste no se elimina entonces forma una pequeña caverna cerrada que puede unirse con otras y formar una caverna de gran tamaño la cual puede calcificarse o abrirse hacia los cálices y uréter provocando estenosis y destruir todo el riñón, convirtiéndose en una pionefrosis o en un riñón mástil.

Los sitios favoritos para la implantación metastásica de los gérmenes durante la bacilemia de la enfermedad, son los focos apicales en los pulmones que tiene una tensión de oxígeno de 120-130 mmHg, lo cual beneficia los requerimientos aeróbicos del germen. La importancia extrapulmonar es de presencia en el cerebro, los riñones y los huesos en crecimiento donde la O_2 es aproximadamente 100 mmHg. (14)

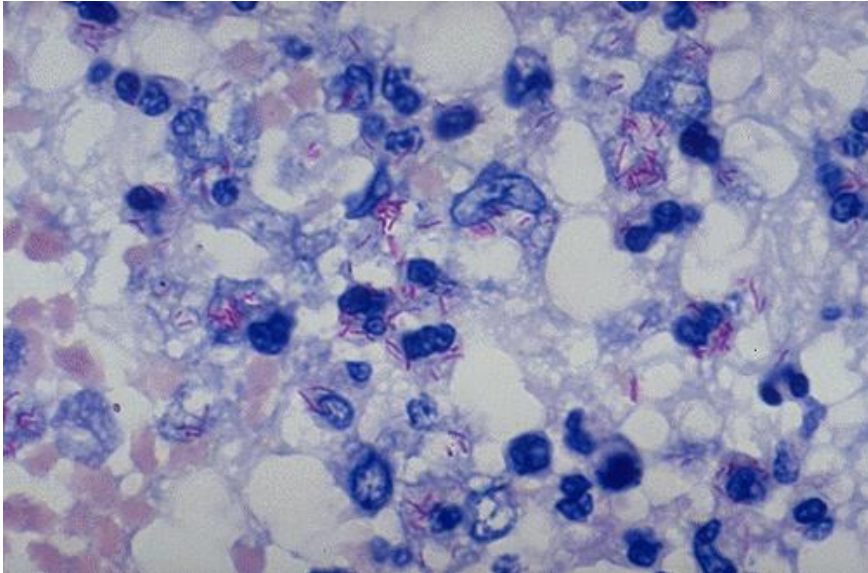


[Riñón](#) retraído y repleto de caseum que le da el aspecto de masilla. El riñón opuesto con leve hipertrofia compensadora.

f. MORFOLOGIA PATOLOGICA

Las lesiones producidas en los órganos por la infección tuberculosa pueden tener diferentes características. En los inicios de la enfermedad las micobacterias causan un proceso inflamatorio con afluencia de polimorfonucleares y macrófagos que fagocitan a los bacilos, estas se multiplican en su interior, produciéndose la destrucción del macrófago y su posterior liberación que da lugar a la formación de un foco pequeño de infiltración que posteriormente va a constituir el granuloma de la tuberculosis. Después de algunas semanas se forman las células gigantes de Langhans y las células epiteliales, que adoptan una disposición ordenada con masas concéntricas que suelen presentar en el centro células gigantes, por lo regular toda esta zona se halla rodeada de linfocitos. Así constituida la lesión, se conoce

como tubérculo o folículo de Koster que es el cuadro microscópico característico de la tuberculosis. (2)



Existen dos formas de afección, la miliar y la caseosa.

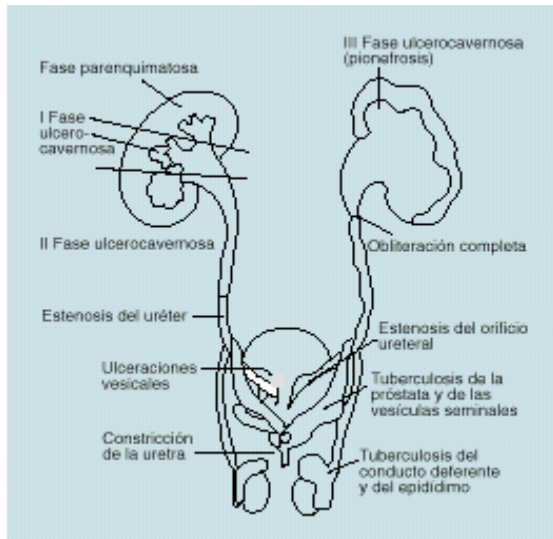
La primera puede aparecer en el curso de una tuberculosis miliar generalizada y se caracteriza por la presencia, en el parénquima renal y especialmente en la corteza, de pequeños nódulos grisáceos de alrededor de 1 mm de diámetro.

Estos nódulos corresponden a pequeños granulomas con necrosis central. La forma caseosa (forma cavitaria o ulcerativa) se caracteriza por la destrucción del parénquima renal, que es reemplazado de manera progresiva por material caseoso.

El proceso se origina de manera focal en la médula, destruye la pirámide y la papila adyacentes y puede ulcerar la mucosa que reviste los cálices renales y así extenderse por vía canalicular a las vías urinarias (pelvis, uréter, vejiga y uretra).

La afectación de las vías urinarias puede dar lugar, con el tiempo, a estenosis cicatrizales.

Más de la mitad de los pacientes tuberculosos urinarios presentan simultáneamente una tuberculosis renal, y en todo varón con una epididimitis crónica debe descartarse la tuberculosis renal con lesión renal asociada. ALKEN ha esquematizado los diversos tipos y la localización de la [tuberculosis](#) renal.



FORMAS DE TUBERCULOSIS-RENAL (ALKEN)

g. PREVENCIÓN

La tuberculosis extrapulmonar es el resultado (complicación) de una infección primaria (pulmonar) el cual por el transcurso del tiempo, fue diseminado a los diferentes órganos del cuerpo a través de las vías sanguíneas y linfáticas. Lo cual es posible prevenir, realizando campañas de educación dirigidos a la población sobre las causas que conllevan, mejorando la calidad nutricional (mejorar las defensas inmunológicas), captación oportuna de los sintomáticos respiratorios (evitar cadena de transmisión) acudiendo a los lugares donde se realiza los diagnósticos de tuberculosis teniendo las sintomatologías clínicas, calidad de los exámenes de los diagnósticos de laboratorio en tuberculosis con personales capacitados (seriado de tres muestras), y en casos de los pacientes (DOTS: terapia directamente observada),

Eliminado: b

cumplir las normas del Programa Nacional de la tuberculosis a través de las redes de laboratorios, capacitación continua de personal en esta área.

Con todo ello llevaremos a una mejoría, disminuyendo la morbilidad, la mortalidad, la tasa de incidencia de la tuberculosis en nuestro país.

Para determinar la sensibilidad, especificidad y eficacia se utilizará los siguientes criterios:

Eliminado: en el presente trabajo

CRITERIOS DE EFICACIA.-

- ❖ Un resultado verdadero positivo (**VP**), cuando la prueba es positiva y el paciente tiene la enfermedad.
- ❖ Un resultado falsamente positivo (**FP**), cuando la prueba es positiva pero el paciente no tiene la enfermedad.
- ❖ Un resultado verdadero negativo (**VN**), cuando la prueba es negativa y el paciente no tiene la enfermedad.
- ❖ Un resultado falsamente negativo (**FN**), cuando la prueba es negativa pero el paciente tiene la enfermedad.

a) Sensibilidad.

La sensibilidad se define como la capacidad de una determinada prueba para detectar los casos positivos. (Proporción de individuos con la enfermedad que presentan un resultado positivo).

Con formato: Sangría: Izquierda: 0.6 pto

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} * 100$$

Con formato: Fuente: Negrita

b) Especificidad.

La especificidad se define como la capacidad de una determinada prueba para detectar las muestras negativas (proporción de individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo).

Eliminado: A

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} * 100$$

Con formato: Fuente:

c) Eficacia.

La eficacia se define como la capacidad de una prueba para detectar correctamente las muestras positivas y negativas.

$$\text{Eficacia} = \frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN}$$

Con formato: Fuente:

2. DESCRIPCION DE LA POBLACION EN ESTUDIO

Nuestra población está conformada por 31 muestras obtenidas de pacientes de ambos sexos, con diagnóstico presuntivo de tuberculosis provenientes de diferentes instituciones durante los meses de mayo - noviembre del 2005. Dichos pacientes que acudieron a las instituciones para un diagnóstico.

3. DESCRIPCION DEL AMBIENTE DE TRABAJO

El Laboratorio SELADIS con infraestructura remodelada, posee 7 pisos para el procesamiento de muestras, repartidos para el área de hematológica, bioquímica clínica, inmunológica, bacteriología, parasitología, microbiología de alimentos, bromatología, HLA, Biología Molecular, y Viroológica, recepción, caja, toma de muestra, oficina de jefatura, sala de descanso y áreas de esterilización y limpieza.

Los ambientes de Biología Molecular en los que se procesaron las muestras, cuenta con equipamiento necesario e indispensable para trabajar tanto con cultivos y PCR presenta un cuarto gris, blanco y azul.

IV. OBJETIVOS.

1. OBJETIVO GENERAL

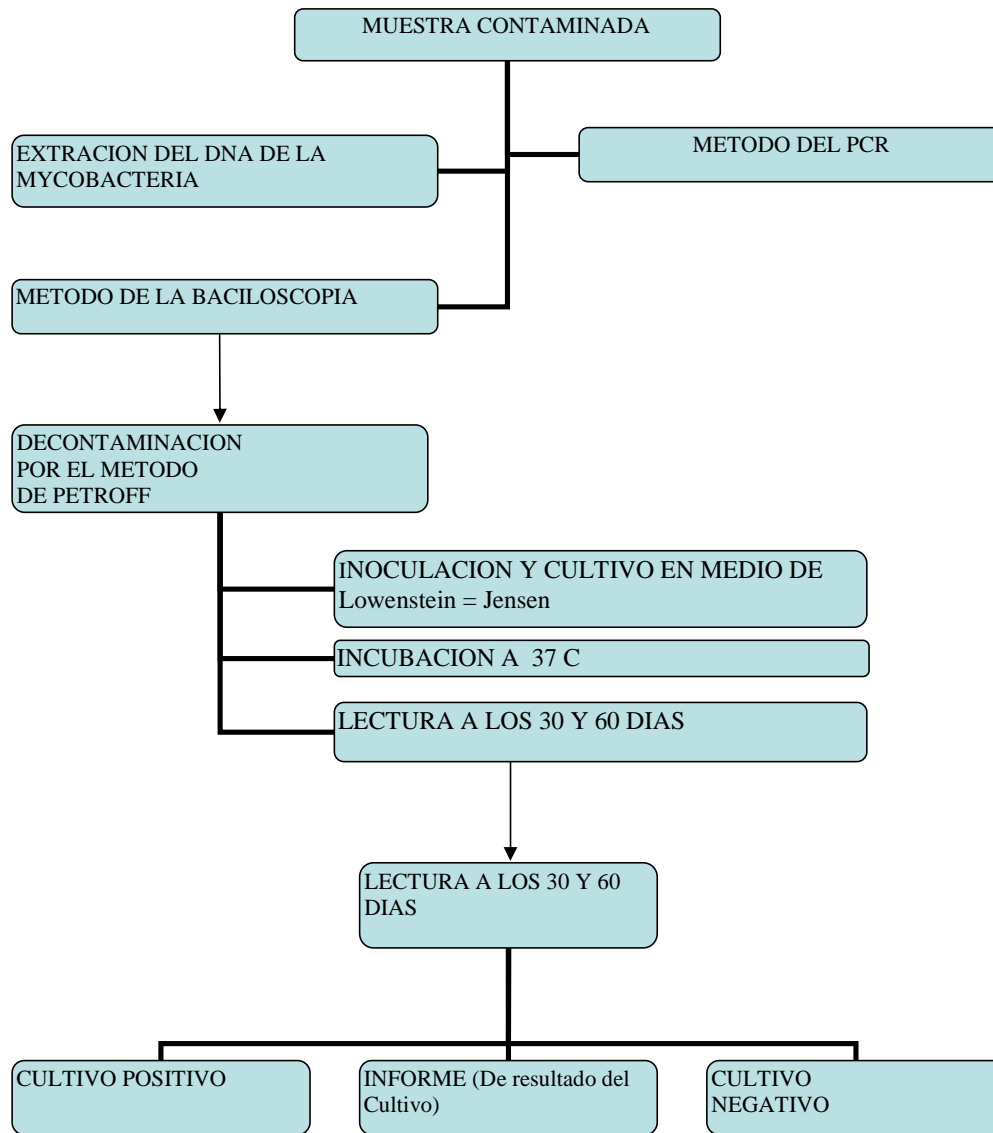
Evaluar métodos de diagnóstico para la tuberculosis renal .

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la **Baciloscopia** en muestras de orina de pacientes con diagnóstico presuntivo de *Tuberculosis Renal*.
- Evaluar **Cultivo de Lowenstein-Jensen** en muestras de orina de pacientes con diagnóstico presuntivo de *Tuberculosis Renal*.
- Evaluar la **Reacción en Cadena de la Polimerasa** en muestras de orina de pacientes con diagnóstico presuntivo de *Tuberculosis Renal*.
- Establecer el test de diagnóstico de las tres técnicas utilizadas.

V. DISEÑO METODOLOGICO.

1. ESQUEMA DEL PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA



2. POBLACION EN ESTUDIO

Se estudiaron un total de 31 muestras de pacientes de ambos sexos (19 varones y 13 mujeres), cuyas edades oscilan entre 5 y 65 años, con diagnóstico presuntivo de tuberculosis renal, los cuales provinieron de los laboratorios Tórax, Centro de Salud Vida y SELADIS.

3. MUESTRAS

a. RECEPCION Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS.

Todas las muestras fueron recepcionadas por el personal de los diferentes Laboratorios, debidamente identificados. Los cuales fueron registrados cuidadosamente en el cuaderno de registro de laboratorio, asignándole un número específico en cada muestra.

b. MUESTRAS CONTAMINADAS.

Las muestras naturalmente contaminadas o muestras recogidas en forma no aséptica por lo que fueron sometidas a procesos de descontaminación

c. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PREVIO AL CULTIVO. CONSERVACION DE LA MUESTRA.

Las muestras recepcionadas en el Laboratorio que no se pudieron procesar en el mismo día de su recepción se conservaron refrigeradas a 4 C hasta su procesamiento.

VI. TECNICAS DE INVESTIGACION.

1. INVESTIGACION DE LABORATORIO

Todas las muestras obtenidas se procesaron en los ambientes de Biología Molecular perteneciente al Laboratorio de Investigación SELADIS.

2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CONTAMINADAS.

METODO DE DESCONTAMINACION DE PETROFF .

Esta descontaminación tiene por objetivo, eliminar la flora bacteriana asociada a *Mycobacterium tuberculosis*, cuyos gérmenes se multiplican más rápido que el bacilo. Y se procedió de la siguiente manera:

Se trabajo dentro de una cámara de bioseguridad de flujo laminar identificada respectivamente y agregando solución de hidróxido de sodio al 4% = en una producción de 1:1 respectivamente y procedemos a centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos. Desechamos el sobrenadante y al precipitado agregamos 1 a 2 gotas de Rojo Fenol (Indicador de pH) luego de agitar obtuvimos una solución homo génea de color naranja, agregando 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico al 4 % agitando hasta lograr un color amarillo-naranja pálido, lo cual nos indica un pH óptimo. La misma con una pipeta Pasteur estéril sembramos en tres tubos con medio de Lowenstein – Jensen previamente identificados, en cada tubo de 2 a 3 gotas de muestra (por inundación) anotando la fecha de inicio del cultivo y con la misma pipeta y muestra se realizo el extendido en un portaobjeto identificada respectivamente luego de ser fijada realizamos la Tinción de Ziehl – Neelsen.

3. BACILOSCOPIA.

Con lápiz diamante se numera en uno de los extremos los portaobjetos nuevos de medida estándar (7.5 cm por 2.5 cm). Se realiza los frotis de todas las muestras.

Con el mechero encendido se procedió a destapar la muestra centrifugada y se coloca junto al portaobjetos que le corresponde. Una vez seleccionada la parte de la muestra, que en el caso de la orina, es el sedimento obtenido por centrifugación por 15 minutos a 3 000 RPM.

Se coloca la muestra en el portaobjetos con la ayuda de pipetas Pasteur estériles y se procede a extenderla con aplicadores de madera, con movimientos circulares y

finalmente de vaivén hasta formar una película lo más uniforme posible, se flamea el portaobjetos por los bordes únicamente par evitar que se derrame la muestra y se coloca en una charola donde se dejará secar a temperatura ambiente.

Los aplicadores de madera se desechan en un frasco de vidrio de un litro de capacidad aproximadamente el cual contendrá hipoclorito al 5%. Una vez terminado el trabajo se desinfectó el área con algodón embebido con hipoclorito al 5% el cual también se desechó en el frasco de vidrio para esterilizarse en autoclave. Es recomendable la protección con bata de maga larga, guantes y mascarilla.

La tinción de Ziehl-Neelsen se hace de la siguiente forma; se fija la baciloscopia con calor, se colocan los frotis sobre varillas y separados por un centímetro, se cubren con fucsina previamente filtrada. Se calientan los frotis flameándolas con una varilla provista en un extremo con torunda embebida en alcohol, hasta que empiece la emisión de vapores se deja de calentar y repite la operación dos veces más. Se elimina el colorante con agua corriente y chorro suave. Se agrega alcohol -ácido por 2 minutos. Se enjuaga con agua corriente y se aplica el colorante de contraste que es el azul de metileno por espacio de 5 minutos. Se enjuaga con agua corriente y se deja escurrir en forma vertical sobre papel absorbente hasta que se seque.

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

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

El criterio a seguir en la baciloscopia es: el número de campos varía según la cantidad de bacilos encontrados:

1. Si no se encuentran bacilos debe examinarse por lo menos 100 campos útiles.

2. Si se encuentran de 1 a 10 bacilos por campo es suficiente observar 50 campos.
 3. Si se encuentran más de 10 bacilos por campo es suficiente observar 20 campos.
- Terminada la observación de la baciloscopia es requisito que se limpie con algodón el objetivo de inmersión para evitar que se transporten fragmentos de una baciloscopia a otra.

4. CULTIVO DE LAS MUESTRAS.

Todas las muestras fueron recultivaron en el medio de Lowenstein – Jensen:

a. MEDIO DE LOWENSTEIN – JENSEN

Fundamento.- Medio sólido a base de huevo, solución buffer, glicerol, asparagina y verde de malaquita. El huevo proporciona los requerimientos de la lecitina, proteínas y factores extrínsecos del carbono y del nitrógeno respectivamente. El verde de malaquita protege el medio contra la contaminación constituyéndose de esta forma un agente selectivo e inhibidor del crecimiento de los microorganismos que no son micobacterias.

b. LECTURA DE LOS CULTIVOS

Para la realización de la lectura de las colonias, se aplicaron las características propias de las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* que son rugosas y cerosas, se desintegran con facilidad, carecen de pigmentación (son de color crema) y crecen lentamente, es decir solo aparecen tres semanas después de la inoculación. Los cultivos dudosos se confirmaron su ácido-resistencia por Tinción de Ziehl – Neelsen. Extrayendo una cantidad muy pequeña de cultivos usando una asa y frotando suavemente en una gota de solución salina estéril en un portaobjeto. A diferencia de algunas otras micobacterias, los bacilos de la tuberculosis no forman suspensiones uniformes. El frotis se dejó secar, se fijó por calor y tinción con el método de Ziehl Neelsen.

Para la identificación preliminar de los bacilos se tomo en cuenta las siguientes características:

Los bacilos de la tuberculosis no crecen en un cultivo primario en menos de una semana y generalmente tardan entre tres y cuatro semanas para que el crecimiento sea visible.

Las colonias son de color beige (nunca amarillo) y rugosas, y tiene el aspecto de las migas de pan o del coliflor.

No se emulsionan en las solución salina utilizada para hacer los frotis, sino que dan una suspensión granular.

Microscópicamente se ubican a menudo en forma de serpentina de longitud variable o se agrupan en asociaciones acordonadas lineales. Las células individuales tienen una longitud de entre 3 micras y 4 micras de longitud.

c. INFORME DE RESULTADOS DE CULTIVO

Según la siguiente escala semicuantitativa:

- (-) No se observan colonias
- Nº Numero total de colonias si hay menos de 20
- (+) De 20 a 100 colonias
- (++) Colonias separadas más de 100
- (+++) Colonias confluentes (se observa desarrollo en toda la superficie del medio)
- (C) Cultivo contaminados.

5. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).-

El principio de la técnica se basa en que cada ciclo de reacción requiere un breve calentamiento para separar las dos cadena del DNA genómico de doble hélice (etapa 1) el éxito de la técnica depende del uso de una DNA polimerasa especial aislada de una bacteria termofila y que es mucho mas estable a temperaturas elevadas que la polimerasa común de modo que nos e desnaturalizara por calentamiento repetidos. El enfriamiento posterior del DNA en presencia de un gran exceso de los dos

oligonucleotidos permite su hibridación específica con las secuencias complementarias de DNA (etapa 2); a continuación se incuba con DNA polimerasa y los 4 desoxirribonucleotidos trifosfato de forma que las regiones del DNA que se hallan en dirección 3 de los cebadores se sintetizan selectivamente (etapa 3).

Para conseguir una amplificación específica del DNA se requiere 20 a 30 ciclos de reacciones cada ciclo dura aproximadamente 5 min. Y un procedimiento automático permite el clonaje en un sistema libre celular de un fragmento DNA en pocas horas cooperando con el tiempo de varios días que se requiere para el clonaje por los métodos Standard.

VII. RESULTADOS.-

Para la comparación de las tres técnicas de diagnóstico PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), Cultivo y Baciloscopia en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, se eligió el cultivo como estándar o de referencia porque tiene una probada sensibilidad del (70- 90 %).

Las muestras que fueron procesadas por cada una de las pruebas de diagnóstico para detectar *Mycobacterium tuberculosis* dieron resultados variados como se puede observar en la tabla 1.

Baciloscopia directa.-

De las 31 muestras de orina examinadas por el método de Ziehl-Neelsen, 13 resultaron positivas (Baciloscopia positivo) y 18 resultaron negativas (Baciloscopia negativa). Lo cual representa un porcentaje de 41.9% y 58.1% respectivamente. (Tabla 2)

Tabla 2
Distribución de muestras de orina. Baciloscopia

	Positivo %	Negativo %	Total
Baciloscopia			
Total	13 (41,9)	18 (58,11)	31(100)

← Con formato: Centrado
← Con formato: Centrado

Cultivo.-

Utilizando como Standard el medio Lowenstein-Jensen, se sembraron todas las muestras de orina previa de contaminación. De las 31 muestras sembradas 26 (83,9) resultaron positivas, y 5 (16,1) fueron negativas al cultivo. (Tabla 3)

Tabla 3
Distribución de las muestras de orina. Cultivo

	Positivo %	Negativo %	Total
Cultivo			
Total	26 (83,9)	5 (16,1)	31(100)

← Con formato: Centrado
← Con formato: Centrado

PCR.-

En la Tabla 4 se muestra los resultados del PCR de todas las muestras de orina amplificadas, 27 (87.09) mostraron la presencia del fragmento de ADN. Mientras que el 4 (12.9) no se detecto la presencia de ADN micobacteriano.

Tabla 4

Distribución de muestras de orina. PCR

	Positivo %	Negativo %	Total %
PCR			
Total	27 (87,09)	4 (12,9)	31 (100)

Con formato: Centrado
Con formato: Centrado

Con referencia a los 26 resultados positivos obtenidos por el cultivo como el (100%); por la PCR se obtuvieron 26 resultados positivos (100%) y la baciloscopia 12 (46,2%) Ver tabla 5 y figura 1. Determinandose 0 falsos negativos por PCR y 14 por la baciloscopia (53,8 %).

Tabla 5. Porcentaje de resultados positivos y falsos negativos de PCR y Baciloscopia referidos al 100% de resultados obtenidos por Cultivo.

PRUEBA	Resultados positivos (%)	Resultados falsos negativos (%)
CULTIVO	100 % (26)	0,0 % (0)
PCR	100 % (26)	0,0 % (0)
BACILOSCOPIA	46,2 % (12)	53,8 % (14)

Con formato: Centrado
Tabla con formato
Con formato: Centrado
Con formato: Centrado
Con formato: Centrado

Con referencia a los 5 resultados negativos obtenidos por el cultivo como el (100%); por la PCR se obtuvieron 4 resultados positivos (80) y la baciloscopia 4 (80%) Ver tabla 6 y figura 1. Determinandose 1 falsos negativos por PCR y 1 por la baciloscopia (20 %).

Tabla 6. Porcentaje de resultados positivos y falsos negativos de PCR y Baciloscopia referidos al 100% de resultados obtenidos por Cultivo.

<u>PRUEBA</u>	<u>Resultados negativos</u> <u>(%)</u>	<u>Resultados positivos</u> <u>(%)</u>
<u>CULTIVO</u>	<u>100 % (5)</u>	<u>0,0 % (0)</u>
<u>PCR</u>	<u>80 % (4)</u>	<u>20 % (1)</u>
<u>BACILOSCOPIA</u>	<u>80 % (4)</u>	<u>20 % (1)</u>

← Con formato: Centrado

← Con formato: Centrado

← Con formato: Centrado

← Con formato: Centrado

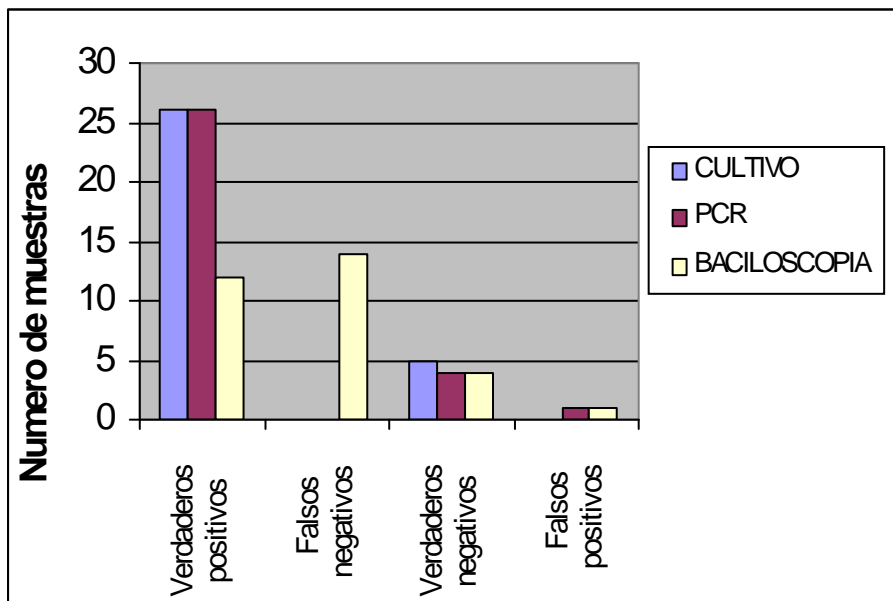


Figura 1. Comparación de resultados obtenidos por las técnicas de diagnóstico Cultivo, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y Baciloscopia.

Para determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas PCR y baciloscopia, se utilizaron tablas 2x2, en las que se incluyen los resultados verdaderos positivos y negativos, así como también los resultados falsos positivos y

falsos negativos, los cuales surgen de la comparación de cada una de estas pruebas con Cultivo (ver tabla 7 y 8).

Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos por las pruebas de diagnóstico, PCR frente a los resultados de la Cultivo.

Eliminado: 6

PCR	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	26	1	27
NEGATIVO	0	4	4
TOTAL	26	5	31

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Tabla 8. Comparación de los resultados obtenidos por las pruebas de diagnóstico, baciloscopia frente a los resultados de la Cultivo.

Eliminado: 7

BACILOSCOPIA	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	12	1	13
NEGATIVO	14	4	18
TOTAL	26	5	31

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

De esta manera la sensibilidad de estas pruebas se obtienen con la formula descrita en la pagina 19. Obteniéndose así una sensibilidad de 100% para el PCR y una sensibilidad del 46,2 % para la baciloscopia Ver figura 2

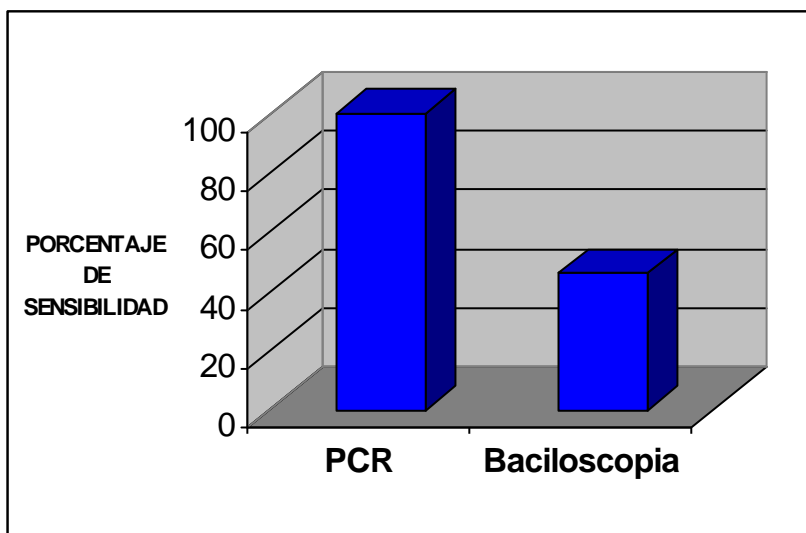


Figura 2. Sensibilidad de las técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y Baciloscopia con relación al Cultivo.

Con respecto a la especificidad obtenida, con las técnicas analizadas, por el PCR se obtuvieron 80,0 % y con baciloscopia 80,0% como se observa en la **figura 3**.

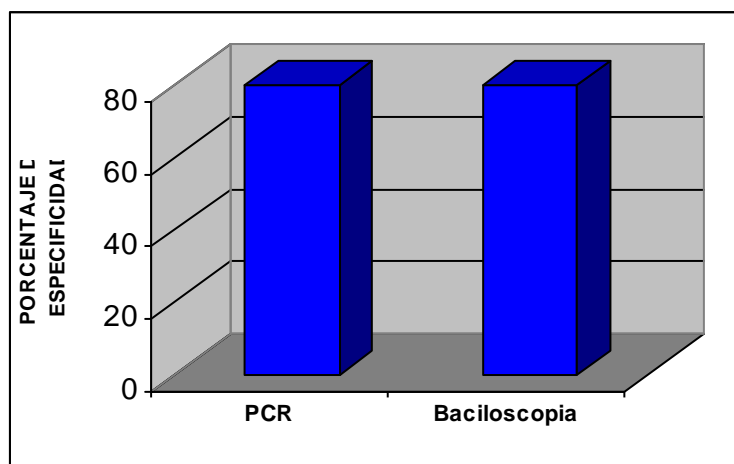


Figura 3. Especificidad de las técnicas de PCR y Baciloscopia con relación al Cultivo.

Eliminado: ¶

¶

Eliminado: 4

Según la determinación de la eficiencia de las técnicas de PCR y Baciloscopia, se determino que el PCR es de 96,8 % y baciloscopia 51,6 %. Ver figura 4.

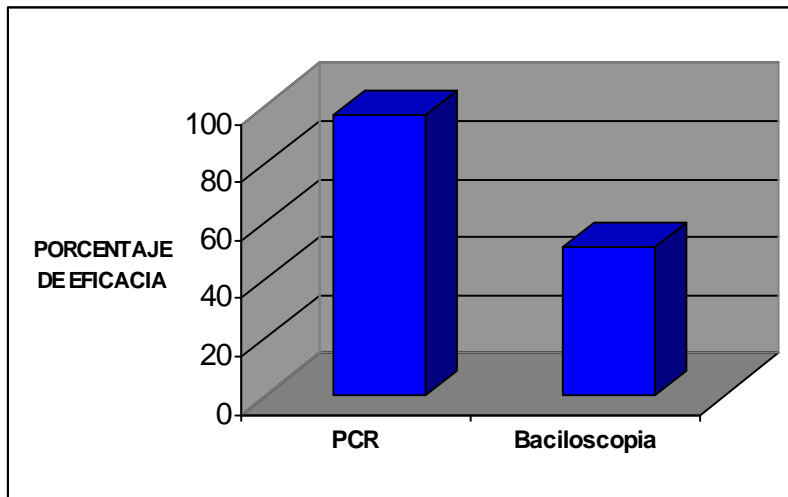


Figura 4. Comparación de la eficacia obtenida por las técnicas PCR y Baciloscopia con relación al Cultivo

Eliminado: ¶
¶
¶

VIII. DISCUSIONES.-

La tuberculosis renal no es la mas frecuente pero tampoco es la mas rara, la demostración de bacilo tuberculoso en la orina es difícil porque la microscopia y el cultivo tienen sus limitaciones.

El rango de sensibilidad de la baciloscopia es de 50 – 80 % y la especificidad es del 100 %. El cultivo en cambio tiene una mayor sensibilidad del 70 – 90 %. El aislamiento del *Mycobacterium tuberculosis* es entorpecido por la lentitud de crecimiento con un promedio de 4 semanas para detectar el crecimiento. De tal manera que en casos que se requiera una detección rápida para su tratamiento esta es limitada.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es muy útil para el diagnóstico de tuberculosis. En la actualidad se han desarrollado varios ensayos de la Reacción en

Cadena de la Polimerasa , para la detección del Mycobacterium a partir de muestras mostrando diversos grados de sensibilidad y especificidad. (4)

En este estudio prospectivo en donde nos propusimos evaluar la utilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis renal, comparándola con las técnicas bacteriológicas habituales, como la baciloscopia y el cultivo.

Al analizar los resultados obtenidos entre la baciloscopia y la Reacción en Cadena de la Polimerasa, encontramos que la sensibilidad de la baciloscopia fue del 46,2 %, mucho menor que la reportada en los trabajos publicados en la universidad mayor de San Andrés (5). Esto probablemente sea debido al hecho que los resultados de la baciloscopia dependen sustancialmente de la carga bacilar de la muestra y nuestros pacientes fueron seleccionados por diagnóstico presuntivo, por lo que es de esperar que las baciloscopias sean consistentemente negativas en estos pacientes.

Apreciamos una baciloscopia positiva con un cultivo negativo. Al estudiar la historia clínica de este paciente (No. 27) nos encontramos que se encontraba recibiendo tratamiento antituberculoso para el momento de la toma de la muestra. Por lo tanto este fenómeno puede deberse a la presencia de bacilos inviables o muertos que son incapaces de crecer en los medios de cultivos. Este paciente igualmente resultó positivo cuando se le practicó amplificación de ácidos nucleicos, ya que esta prueba detecta la presencia del ADN micobacteriano.

Encontramos que la sensibilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en nuestro estudio fue del 100% y la especificidad fue del 80,0 %. Sin embargo algunos estudios reportan una sensibilidad relativamente más baja, como Andersen y cols. (6) y Cohen y colaboradores (7), quienes encontraron sensibilidades para sus ensayos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de 63 y 73% respectivamente. La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica que requiere una estandarización minuciosa para evitar los problemas de la contaminación. Estas bajas sensibilidades encontradas por estos autores pudieran explicarse por condiciones subóptimas de la prueba.

Cuando comparamos los resultados de la amplificación de ácidos nucleicos con el cultivo observamos que la sensibilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa fue mayor que las técnicas bacteriológicas tradicionales. Todos los pacientes con baciloscopias positivas y cultivos positivos, resultaron también positivos cuando se aplicaron las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. En un pacientes con examen directo y cultivo negativo la RCP fue positiva. Por lo tanto la RCP puede considerarse una herramienta muy útil para el diagnóstico de tuberculosis renal, con sensibilidades mayores que las pruebas bacteriológicas rutinarias.

Todas las amplificaciones positivas mostraron las bandas correspondientes a las secuencias : una banda de 506 pares de bases, que corresponde a la s ecuencia de bases que codifica a la proteína de 32 KDa, el cual está presente en todas las micobacterias (incluyendo *Complejo M. tuberculosis* y *M. leprae*) y que parece ser uno de los principales estimulantes de la respuesta celular y humoral contra las micobacterias (8), y otra banda de 984 pares de bases, que corresponde a los genes que codifican a la secuencia de inserción IS 6110, el cual es específico para el *Complejo M. tuberculosis*, que incluye el *mycobacterium* tuberculoso humano y bovino (9), permitiendo identificar infecciones producidas por el *Complejo M. tuberculosis*, con mucha mayor sensibilidad y especificidad que el examen directo y el cultivo. Sin embargo recientes reportes han demostrado que existen algunas cepas de *M. tuberculosis* que no poseen la secuencia IS6110 en sus genomas (10). Así, el uso de métodos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa basados en IS6110 puede conducir a resultados falsos negativos. Por otra parte, métodos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa basados exclusivamente en la secuencia IS6110, no discriminan entre *M. tuberculosis* y otras micobacterias del *Complejo M. tuberculosis* (10).

En el presente estudio, demostramos que el uso de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa, basadas en la amplificación simultánea del elemento de inserción IS 6110 y del gen que codifica el

antígeno alfa en un solo paso puede identificar infecciones por micobacterias a partir de muestras de orina.

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos indudablemente aumentan la rapidez diagnóstica, pero ellas, hasta la actualidad, no reemplazan el examen directo de orina o el cultivo micobacteriano, esencial para la identificación del microorganismo (las pruebas de amplificación sólo dan resultados para el Complejo M. tuberculosis), así como para la realización de pruebas de sensibilidad a antimicrobianos. Su especificidad es muy variable entre diferentes laboratorios. Además las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos frecuentemente permanecen positivas después que los cultivos se hacen negativos durante la terapia y pueden permanecer positivas incluso después de finalizar la terapia antituberculosa. Por lo tanto las pruebas de amplificación de ácidos no sustituyen a las pruebas bacteriológicas tradicionales para el diagnóstico de la tuberculosis.

No se recomienda utilizarlas en forma rutinaria para el diagnóstico de la enfermedad, sino dependiendo del contexto clínico, epidemiológico y radiológico del paciente.

|

IX. CONCLUSIONES.-

- Los resultados presentados demuestran que la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es más sensible que los procedimientos bacteriológicos de rutina (examen directo y cultivo) y la convierten en una herramienta muy útil para el diagnóstico de tuberculosis renal y otras enfermedades micobacterianas.
- La baciloscopia para tuberculosis renal no es muy recomendable ya que presenta una sensibilidad del 46,2 % es mucho mas baja que las baciloscopias en tuberculosis pulmonar, su especificidad es del 80% y la eficacia de un 51,6% lo cual confirma que no es una técnica recomendable en casos de tuberculosis renal.
- El cultivo por su parte sigue siendo una técnica estándar para la tuberculosis renal pero el tiempo para un diagnostico final es muy largo y perjudicial para el tratamiento del paciente.
- En cambio la Reacción en Cadena de la Polimerasa el diagnostico es mas rápida, tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80 % es una nueva técnica que puede apoyar al cultivo en el diagnostico de tuberculosis renal ya que su eficacia es del 96,8 %.

X. RECOMENDACIONES.-

El diagnóstico de tuberculosis es de mucho cuidado, ya que se necesita un tratamiento rápido por la evolución de la enfermedad, por tal motivo las pruebas más utilizadas como la baciloscopia, cultivo y PCR siempre deben ir acompañadas para descartar o verificar como va la evolución del tratamiento o de la enfermedad. La baciloscopia aunque es más rápida no es muy certera ya que puede observarse varios tipos de mycobacterias, en cambio el cultivo es mucho más seguro pero debido a su tiempo de incubación es muy larga la espera para el diagnóstico, en cuanto a la Reacción en Cadena de la Polimerasa es mucho más eficaz, rápida y sensible pero no sustituye a las pruebas bacteriológicas tradicionales para el diagnóstico de la tuberculosis.

No se recomienda utilizarlas en forma rutinaria para el diagnóstico de la enfermedad, sino dependiendo del contexto clínico, epidemiológico y radiológico del paciente.

XI. BIBLIOGRAFÍA.-

1. CAMACHO, Mirtha et al. Informe de la Reunión Nacional de la Red Nacional de Laboratorio de Tuberculosis. Octubre 1996. Sucre-Bolivia.
2. JAWETZ Ernest et al. Microbiología Médica. 12a edición 1987. Editorial manual Moderno .México D.F.
3. Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis. Aislamiento e identidad de Micobacterium. Volumen 6.1973. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires – Argentina.
4. CDC. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. 2000 49(26):593-594.
5. GORDING F, Slutkin G. The validity of acid fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Arch Path Lab Med 1990; 114: 1025 -1027.
6. Boletín Informativo de Medicamentos, Centro de Información y Documentación del Medicamento (CIDME) BIM No 31, Abril 1997 FCFB-UMSA.
7. Manual de Laboratorio, Red Nacional de Laboratorio de Tuberculosis, Ministerio de Salud y Prevención Social. INLASA, Año 2002.
8. TRIGOSO, Christian-Huarita y Zegarra, Bacteriología Básica, UMSA-Facultad de Medicina, Bolivia, 1992
9. http://www.infecto.edu.uy/casos7caso_tbc8.html,2004
10. http://www.bago.com/ginecored/gineco70_wep.Asp,2004
11. CORREA, Arias, Pérez, Carbonell. Texto de Patología. Ed Carvajal y Cia, Colombia
12. MORENO S. Edgar. Apuntes de Neumofisiología-UMSA
13. KONEMAN, Elmer y cols. Diagnostico Microbiológico. 3ra. Edición Buenos Aires 1992.
14. SALVAT. Diccionario Medico 3ra Edición 1994
15. Curso de Actualización- En tuberculosis. FCFB-SELADIS – UMSA 38 al 30 de abril del 2004.La Paz - Bolivia.
16. ANDERSEN, A. B., S. Thybo, P. Godfrey-Faussett, and N. G. Stoker. Polymerase Chain

17. COHEN RA; Muzaffar S; Schwartz D; Bashir S; Luke S; McGartland LP; Kaul K. Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission. Am J Respir Crit Care Med 1998;157 (1):156-6.
18. BORREMANS M; de Wit L; Volckaert G; Ooms J; de Bruyn J; Huygen K; van Vooren JP; Stelandre M; Verhofstadt R; Content J. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1989; Oct; 57(10):3123-30.
19. EISENACH DK, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT., Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 1160-1163.
20. T.D. Mchugh, I. E. Newport, and s. H. Gillespie. IS6110 Homologs Are Present in Multiple Copies in Mycobacteria Other than Tuberculosis -Causing Mycobacteria. J Clin Microbiol 1997; 35: 1799-1771.

ANEXOS

ANEXO 1

Edad.-

La tuberculosis renal como se puede observar esta en función al incremento de edad, donde la mayor frecuencia esta entre 51 y 65 años de edad con 17 pacientes.

Ver figura5.

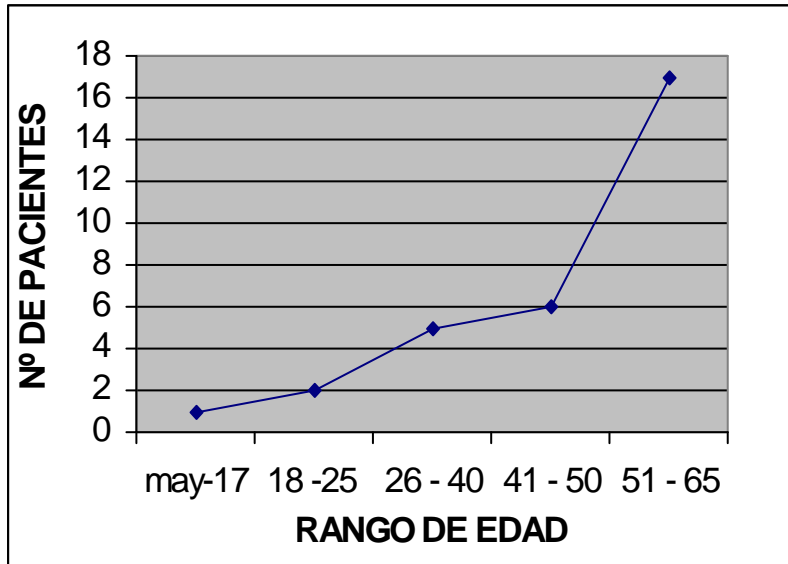


Figura 1. Frecuencia de rango de edades versus numero de pacientes.

ANEXO 2.

Sexo.-

Tabla 1. La tuberculosis renal se presenta más en el género masculino como se puede observar en la figura 6.

Distribución de muestras de orina. Sexo

	Femenino	Masculino	Total
Sexo			
Total	12(38,71)	19 (61,29)	31 (100)

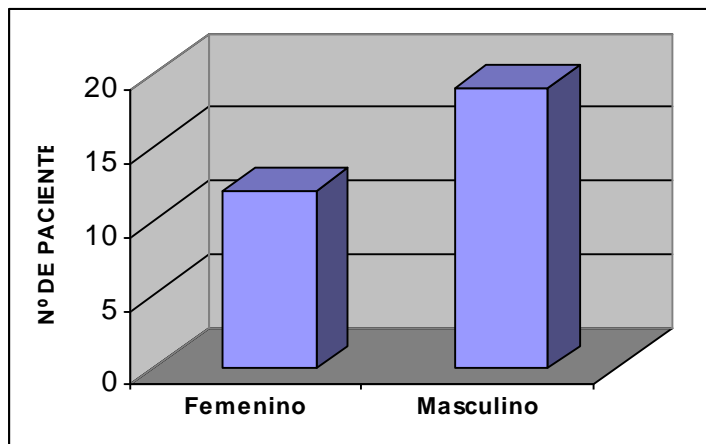


Figura 2. Frecuencia de pacientes versus genero.

ANEXO 3.

PREPARACION DEL MEDIO LOWESTEIN – JENSEN

Componentes

Solución de sales

Fosfato de monopotasio anhídrido (KH ₂ PO ₄)	2,4 g
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,24g
Citrato de Magnesio	0,6 g
Asparagina	3,6 g
Glicerol	12 ml
Agua destilada	600 ml

Disuelva los componentes en el orden indicado en agua destilada aplicando calor. Coloque en un autoclave a 121°C durante 30 minutos para esterilizar. Enfríe a temperatura ambiente.

Asépticamente disuelva el colorante en agua destilada estéril colocando la solución en la incubadora durante 1 a 2 horas.

Solución verde malaquita al 2%	2,0 g
Agua destilada	100 ml

Huevos enteros homogenizados

Huevos de gallina, frescos, de no más de siete días se limpian fregando con un cepillo de mano en agua tibia y jabón alcalino común. Deje los huevos en remojo durante 30 minutos en la solución jabonosa. Enjuague en agua corriente y sumérjalos en etanol al 70% durante 15 minutos. Cepílese bien las manos y lávelas. Quiebre los huevos con un cuchillo estéril y bátalos con un batidor estéril.

Preparación del medio completo

En un matraz grande se agrega asépticamente los componentes siguientes y se mezcla bien:

Solución de sales	600 ml
Solución de Verde de Malaquita	20 ml
Huevos homogenizados	1000ml

El medio terminado se distribuye en volúmenes de 6 a 8 ml en tubos de ensayo estéril con tapa de rosca y ajustar las tapas con firmeza

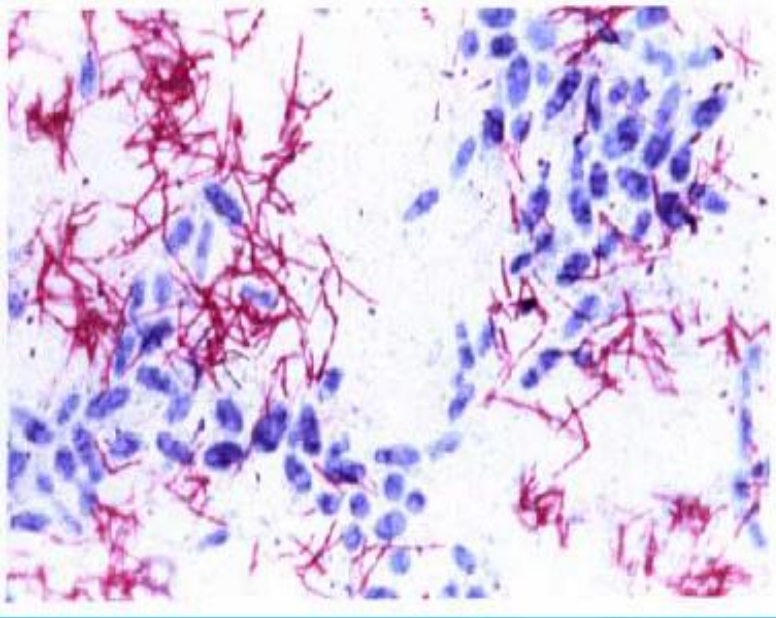
Coagulación del medio

Antes de colocar los medios ajuste la temperatura del espesador 80°C para que el calentador sea más rápido. Coloque los tubos en el espesador en posición inclinada y coagule el medio durante 45 minutos entre 80 y 85 °C

Almacenamiento

Los tubos de medio Lowestein – jensen deben fecharse y almacenarse en le refrigerados. Debería mantenerse en condiciones durante varias semanas con tapas bien ajustadas. El medio no debe almacenarse más de 3 meses.

ANEXO 4.



Vista del *Micobacterium tuberculosis* después de la tinción Ziehl-Nielsen

ANEXO 5.



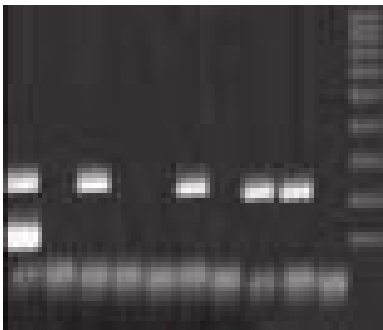
Colonias en el cultivo de medio lowestein – jensen

ANEXO 6.

LECTURA DE PCR



ANEXO 7.



Lectura del PCR