



Revista Médica de la
Universidad de Costa Rica

<http://www.revistamedica.ucr.ac>.



Artículo de investigación exploratoria

Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en cortes histológicos embebidos en parafina: investigación exploratoria.

Suárez Sánchez, María José^{1,2}; Quiros Alpízar, José Luis²; Jiménez Montero Ernesto³ y Salazar Sánchez, Lizbeth¹

¹ Centro de Investigaciones en Hematologías Anormales y Trastornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

² Laboratorio de Histotecnología, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica. ³ Servicio de Patología, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

Resumen: Se evaluó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias atípicas en tejidos parafinados. Para ello se analizaron 7 casos del Hospital San Juan de Dios (HSJD) con diagnóstico sugestivo de tuberculosis y se compararon los resultados obtenidos por PCR con el diagnóstico histopatológico y la historia clínica de los pacientes. De los siete casos analizados, tres resultaron positivos para *M. tuberculosis*, tres para micobacterias atípicas y un caso resultó negativo. Para evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica se necesita un estudio con un mayor número de muestras pero se pudo demostrar que es posible realizar el diagnóstico molecular de tuberculosis en muestras fijadas en nuestro país, sin embargo se debe de considerar ésta como una herramienta diagnóstica que se debe complementar con la historia clínica de cada paciente.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, biopsias parafinadas, diagnóstico molecular.

Recibido: Febrero 2010. Aceptado: Marzo 2010. Publicado: Marzo 2010.

Abstract: We evaluated the Polimerase Chain Reaction (PCR) technique for the diagnose of *Mycobacterium tuberculosis* and non-typical mycobacterias in paraffin-embedded histologic specimens. We analyzed 7 cases from the San Juan de Dios Hospital (HSJD) with suggestive diagnose of tuberculosis and we compared the obtained result from PCR with the histopathological diagnosis and the clinical records. Three of the seven patients evaluated resulted positive for *M. tuberculosis*, other three resulted positive for non-typical mycobacterias, and the remaining patient resulted negative. In order to evaluate sensibility and specificity of the technique a bigger sample research is required but it was possible to prove that molecular diagnosis of tuberculosis can be made in fixed samples in our country, even though this technique must be considered as a diagnostical tool that is a complement of the clinical record of the patient.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, paraffin-embedded biopsy, molecular diagnosis.

Introducción

La tuberculosis continúa siendo una de las principales causas de muerte por agentes infecciosos en el mundo, con casi nueve millones de nuevos casos al año (1). Actualmente la Organización Mundial de la Salud ha declarado a la tuberculosis como un problema de emergencia mundial debido principalmente al sinergismo entre *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, y el virus de la inmunodeficiencia humana (2,3); todo esto unido al hecho alarmante que representa la aparición de cepas multiresistentes al tratamiento. En Costa Rica actualmente 12 de cada 100.000 costarricenses se enferman de tuberculosis al año y 2,3 de cada 100.000 costarricenses fallecen por tuberculosis (4).

Esta enfermedad debe de tratarse de forma adecuada para disminuir la transmisión a contactos y mejorar la calidad de vida del paciente, pues es una enfermedad que sin tratamiento puede ser fatal. Sin embargo, el diagnóstico de tuberculosis es complejo, depende de la clínica que el paciente presenta, acompañado de exámenes radiológicos, intradermorreacción y exámenes bacteriológicos (5).

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo aerobio estricto, que al ser teñido es alcohol-ácido resistente, no posee movilidad y su crecimiento es lento (6). El diagnóstico etiológico de la infección depende por lo tanto, de la demostración microscópica de los bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) y su aislamiento e

identificación en medios de cultivo (6). La sensibilidad de las tinciones BAAR oscila entre un 40% y un 85% y para ello se requiere generalmente, al menos tres muestras del mismo paciente. Aunque el cultivo es el método de confirmación diagnóstica, con una sensibilidad de 80% a 96%; tiene el inconveniente de presentar tiempos de incubación de hasta ocho semanas (7).

Con mucha frecuencia se sospecha el diagnóstico de tuberculosis en biopsias cuando se observa un patrón de inflamación crónica granulomatosa con necrosis, no obstante, esta condición puede deberse a otras causas diferentes a la tuberculosis, tales como reacciones ante agentes extraños, infecciones fúngicas, sarcoidosis, brucelosis, etc. Y cuando se realizan tinciones especiales para BAAR en el tejido, muchas veces no se logra observar el agente causal.

Así mismo, es importante considerar la presencia de micobacterias no tuberculosas o atípicas ya que la frecuencia con la que se aíslan recientemente ha aumentado tanto en pacientes inmunosupresos como inmunocompetentes y tanto su diagnóstico como tratamiento son difíciles, principalmente en casos cuando se ven involucradas cepas fastidiosas o resistentes al tratamiento antimicrobiano (8).

Actualmente las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta para la identificación de micobacterias incluso a nivel de especie, para muestras donde los métodos tradicionales no resultan suficientes. Dentro de estas técnicas moleculares se encuentra la Reacción

en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que en condiciones óptimas puede detectar de 1-10 microorganismos en un tiempo mucho menor al cultivo (3-5 días). Así mismo gracias a los métodos de extracción disponibles es posible el aislamiento a partir de cualquier muestra biológica (5).

Debido a que el uso de la técnica de PCR anidado específico para *M. tuberculosis* permite establecer un diagnóstico de tuberculosis rápido y sensible; y que en Costa Rica no se ha implementado este método para analizar las muestras biológicas fijadas en parafina, el objetivo de este estudio fue analizar por medio de esta técnica siete muestras con diagnóstico sugestivo de tuberculosis y comparar los resultados obtenidos con la clínica y evolución de los pacientes respectivos.

Métodos y materiales

Muestras: se realizó una base de datos de biopsias con inflamación crónica granulomatosa que se presentaron en el Servicio de Patología del Hospital San Juan de Dios entre los años 2003 y 2009. Se seleccionaron siete casos de diferentes años y sitios anatómicos sospechosos de tuberculosis, se observó las láminas respectivas para la selección de los bloques.

Extracción de ADN: se realizó de 3 a 10 cortes de 10µm de cada bloque parafinado y se trató con xilol y alcohol para su desparafinización, el tejido obtenido se digirió con buffer lisis y proteinasa K.

Amplificación de ADN¹: Para la amplificación de secuencias correspondientes a *M. tuberculosis* se realizó un PCR anidado, para el primer PCR se utilizó 5 µl del ADN extraído y un volumen final de reacción de 45 µl con 5µM dNTP, 0.25 U *Taq* polimerasa (Gold Applied biosystems), 45 µM del imprimador FW y 68 µM del RV, la secuencia de estos es: FW CGGGACCACCCGCGGCAAAGCCCGCAGG AC y RV CATCGTGGAAGCGACC CGCCAGCCCAGGAT. Las condiciones del PCR fueron 20 ciclos con una desnaturalización inicial de 94°C por 90 segundos; una hibridación a 63°C por 90 segundos y una extensión a 75°C por 90 segundos. Se utilizó 1 µl del producto del primer PCR para el segundo PCR, para éste el volumen final de reacción fue de 48 µl con 5µM dNTP, 0.25 U *Taq* polimerasa (Gold Applied biosystems), 140 µM del imprimador FW y 108 µM del RV, la secuencia de estos es: FW CCTGCGAGCGTAGGCGTCCG y RV CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% marcados con bromuro de etidio. A las muestras en que se obtuvo un resultado negativo se les realizó un PCR específico para el gen constitutivo *p53* con el fin de evaluar la calidad del ADN y otro para micobacterias atípicas con el kit Atypical Mycobacteria kit de Experteam que amplifica secuencias correspondientes a *M.gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* y *M. malmoense*. Se realizó nuevamente una electroforesis con un gel de agarosa al 2% con los productos obtenidos.

¹ El protocolo corresponde al utilizado en el Hospital de Santa Clara, Trento, Italia.

Presentación de resultados

De las siete muestras analizadas tres resultaron positivas para *M. tuberculosis* (Fig 1), de las cinco muestras restantes se obtuvo un

producto de amplificación en una muestra después de realizar el PCR para *p53* y en las tres restantes al realizar el PCR específico para micobacterias atípicas (Gráfico 1) (Cuadro 1).

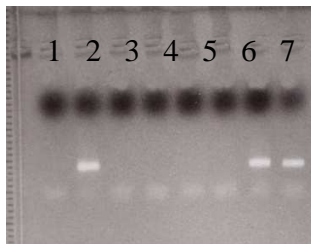


Figura 1. Electroforesis del PCR para *Mycobacterium tuberculosis* en los siete casos analizados. Carril 1 blanco de amplificación, carriles 2, 7 y 8 muestras positivas, carriles 3, 4, 5 y 6 muestras negativas.

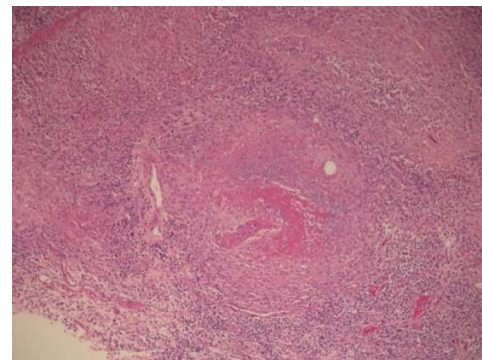


Fig 3. Microfotografía de pared intestinal que muestra la formación de un granuloma con necrosis caseosa. Tinción de Hematoxilina-Eosina (20x).

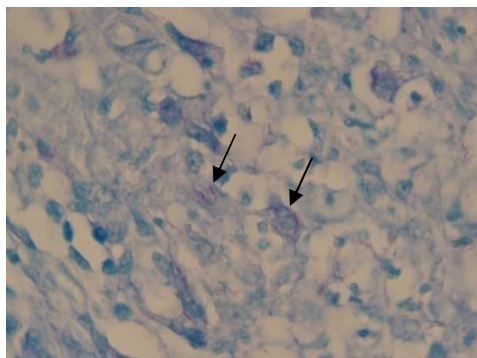
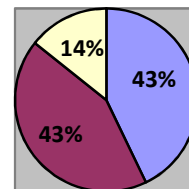


Figura 2. Microfotografía de intestino que muestra BAAR. Tinción de FITE-Faraco (100x).



■ *Micobacterias atípicas*
 ■ *M. tuberculosis*
 □ Negativas

Gráfico 1. Resultados obtenidos tras analizar las 8 muestras por PCR para *M. tuberculosis* y *Micobacterias atípicas*

Cuadro 1. Casos de pacientes con enfermedad crónica granulomatosa, características clínicas, histopatológicas y moleculares.

Caso	Caracterización clínica	Diagnóstico histopatológico	PCR 1	PCR 2	PCR 3	Resultado
1	Masculino, 56 años, hipertenso y diabético, tabaquista, antecedente de TB tratada hace 14 años, quien consulta por un cuadro de disnea de esfuerzo asociado a dolor torácico y malestar general, a quien se le documenta masa en segmento basal anterior del pulmón derecho.	Pulmón Granulomas caseosos compatibles con TB	P	--	--	Muestra con <i>M. tuberculosis</i>
Caso	Caracterización clínica	Diagnóstico histopatológico	PCR 1	PCR 2	PCR 3	Resultado
2	Femenina, 79 años, con hipertensión riesgo C, cardiopatía hipertensiva, insuficiencia cardiaca congestiva NYHA III- IV, diabética, reacción con infiltrado basal derecho. Derrame Pleural con cultivo (-) y cor pulmonale con acidosis respiratoria compensada con hipoxemia y dímero D (+).	Biopsia pleural	P	--	--	Muestra con <i>M. tuberculosis</i>
4	Masculino de 51 años nicaragüense, con factores de riesgo social, alcohólico, tabaquista, diagnosticado con TB hace 8 días con tx antifímico, consulto por epigastralgia y somnolencia, presentó	Pulmón ICG compatible con TB	N	N	P	Muestra con Micobact. atip.

	neumotórax derecho a repetición por lo que requirió neumonectomía.					
5	Femenina, 69 años, hipertensa, antecedente heredo familiares de TB en madre y hermana, consulta por lumbalgia de 1 mes de evolución, TAC: aplastamiento de L2 con rarefacción ósea.	Hueso con ICG compatible con TB	N	N	P	Muestra con Micobact. atip.
6	Masculino, 65 años, agricultor, tabaquista, consulta por dolor abdominal, abdomen muestra múltiples nódulos en bazo y esplenomegalia.	Bazo Granulomatosis esplénica tipo sarcoidosis	N	N	P	Muestra con Micobact. atip.
7	Masculino, 72 años, antecedente de carcinoma renal hace 15 años. Presenta radiografía de tórax con lesiones sospechosas de metástasis.	Pulmón Lesiones granulomatosas caseificantes	N	P	N	Muestra negativa para Micobacterias

*PCR1 corresponde al PCR para *M.tuberculosis*; PCR2 al PCR para *p53*; PCR3 al PCR para micobacterias atípicas; ICG, inflamación crónica granulomatosa; TB, tuberculosis; N, negativo; P, positivo.

Discusión

Los estudios moleculares para el diagnóstico de tuberculosis constituyen una nueva y valiosa herramienta que puede facilitar y mejorar la velocidad del diagnóstico y manejo de los pacientes (3, 9). En el caso del PCR, éste se puede realizar tanto en muestras de esputo como muestras parafinadas, las muestras de esputo tienen la ventaja de que pueden ser cultivadas, no así las muestras parafinadas por lo que en estos casos, el diagnóstico en nuestro país, se limita a la tinción de láminas histológicas.

Diversos reportes muestran que la técnica de PCR constituye una forma rápida y sensible que permite amplificar fragmentos de ADN de *M. tuberculosis* en tejidos parafinados aún cuando éste se encuentre en cantidades muy pequeñas (5, 9). Los principales factores que intervienen en la amplificación de ADN en estos tejidos son tamaño de fragmento diana a amplificar, copias del fragmento en el genoma, concentración de ADN, fijación de la muestra (10, 11).

En el presente estudio se utilizó un PCR anidado cuyo producto de amplificación es de aproximadamente 180 pares de bases, la principal ventaja del PCR anidado es que la combinación de las dos reacciones en secuencia permiten alcanzar una alta sensibilidad sin afectar su especificidad, esto sumado a la amplificación de un fragmento diana pequeña permite obtener mejores resultados (12).

La implementación del método de PCR puede presentar algunas limitaciones como lo son las alteraciones en el ADN por cambios estructurales debido a la fijación deficiente del tejido en formalina y esto varía según el tratamiento que reciba la muestra (13). Así por ejemplo un estudio

anterior presentó un porcentaje de amplificación de 50% en biopsias tratadas en el HSJD (13). En el presente estudio, se asumió que la calidad de ADN de los casos positivos por *M. tuberculosis* era adecuado puesto que se obtuvo un producto de amplificación; a las 5 muestras que resultaron negativas se les realizó un PCR para el gen *p53*, un gen constitutivo, con el fin de evaluar la calidad del ADN, 3 de estas resultaron negativas. Sin embargo, estas 3 mismas muestras fueron positivas para micobacterias atípicas (cuadro 1) lo que implica que en este PCR se pueden obtener productos aún cuando el ADN se encuentre degradado.

Las sensibilidades y especificidades reportadas varían entre los diversos estudios, Barrón y colaboradores reportan una sensibilidad de 96,6 % y una especificidad de 100% en muestras de biopsias pleurales en parafina mientras que Park y colaboradores presentan una sensibilidad de 78% y una especificidad de 88%, que al igual que este estudio, se realizó en muestras de diferentes sitios anatómicos también en parafina. Por ser este un estudio exploratorio no se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad, pero se demostró que es posible la detección de micobacterias por PCR en los casos valorados.

En nuestro estudio tres de los siete casos fueron positivos en la PCR para *M. tuberculosis*, de los cuales dos presentan correlación con la clínica y uno de ellos, además, presentó identificación histológica de BAAR positivos en la tinción de FITE (el único de todos los casos analizados en donde se pudo observar). El tercero de estos casos no presenta correlación evidente con la

clínica, esto se puede interpretar de la siguiente manera:

- Que sea un verdadero positivo. Beige y colaboradores continuaron realizando cultivos a muestras cuyo PCR era positivo pero no se contaba con otras características diagnósticas y lograron obtener cultivos positivos. Ellos concluyeron que el PCR es una técnica más sensible que permite un diagnóstico más temprano (3).
- Que sea un falso positivo por contaminación. En un estudio multicéntrico se encontró altos niveles de falsos positivos en diferentes laboratorios (de 3% a 20%) debido principalmente a contaminación cruzada (14).
- Que el ADN amplificado corresponda a fragmentos de ADN de *M. tuberculosis* degradado o latente que no presente relevancia clínica (3, 9).

A los cuatro casos negativos para *M.tuberculosis* por PCR se les realizó el PCR para el gen *p53*, en tres de ellos fue negativo confirmando la mala calidad del ADN. Es importante tomar en cuenta que un resultado negativo para *p53* implica que el ADN se encuentra degradado y por lo tanto no se puede concluir que sea negativo para *M. tuberculosis*. Sin embargo, el PCR para micobacterias atípicas puede ser aplicado en este tipo de muestras ya que los productos de amplificación son pequeños y pueden estar conservados. Pero, cuando el ADN está degradado y el resultado es negativo, no se puede descartar la infección.

Los tres casos positivos para micobacterias atípicas presentan correlación clínica e histopatológica pero al tener ADN degradado no se puede descartar la presencia también de *M. tuberculosis*.

Llama la atención, que el único caso negativo para los diversos tipos de micobacterias presentó amplificación para *p53*, pero una clínica altamente sospechosa para tuberculosis apoyado además en la histopatología por lo que concluimos que podría ser un falso negativo.

Conclusiones

- El protocolo empleado permite el diagnóstico molecular de micobacterias en los tejidos estudiados pero es importante realizar un estudio de mayores dimensiones para evaluar su sensibilidad y especificidad.
- Cuando el ADN está degradado se puede obtener resultados positivos para micobacterias, pero un resultado negativo no se puede descartar infección.
- Se debe de tomar en cuenta la existencia de falsos positivos para optimizar el protocolo de diagnóstico.
- Las discrepancias entre PCR y la clínica deben ser valoradas con cuidado y de forma individualizada.
- Aunque se ha descrito que la técnica de PCR es sensible para el diagnóstico de micobacterias, siempre se debe de correlacionar con la clínica y hallazgos histopatológicos.

Agradecimientos

Esta investigación se llevó a cabo gracias a la colaboración del Dr. Barbareschi, a Girlando Salvatore, Ana María Piccolo y el Servicio de Patología del Hospital de Santa Clara, Italia, al Dr. Porrás y el Servicio de Patología del Hospital San Juan de Dios, el Dr. Marco Zuñiga Director Departamento Anatomía UCR y a Kenneth Ernest y Emmanuelle Vargas.

Bibliografía

- Zager, E & Mcnerney, R. Multidrug-resistant tuberculosis. BMC infections disease. 2008; 8 (10).
- Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis. Programa Regional de tuberculosis. 2003; 6 (1): 1-6.
- Beige, J; Schaberg, T; Finkh, U *et al.* Clinical Evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology. 1994; 33 (1): 90-95.
- Ministerio de Salud, Costa Rica. Indicadores Básicos de Salud: situación de la salud en Costa Rica. <http://www.ministeriodesalud.go.cr/estaindibas.htm?criterio=tuberculosis>. Accesada el 10 de noviembre, 2008.
- Barrón, H; Monteghirfo, M & Rivera, N. Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. An Fac Med Lima. 2006; 67 (1): 11-18.
- Sociedad Argentina de Pediatría, Comité Nacional de Neumología y Comité Nacional de Infectología. Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. Arch Argent Pediat. 2002; 100 (2).
- Chakravorty, S; Dudeja, M; Hanif, M *et al.* Utility of universal example process methodologic, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43 (6): 2703-2708.
- Somoskovi, A; Mester, J; Hale, Y *et al.* Laboratory of nontuberculese mycobacteria. Clinics in chest medicine. 2002; 23: 585-597.
- Park, D; Kim, J; Un Choi, K *et al.* Comparision of Polymerase Chain Reaction with histopathologic features for diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin- embedded histologic specimens. Arch Pathol Lab Med. 2003;127: 326-330.
- Marchetti, G; Gori, A; Catozzi, L; *et al.* Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36: 1512-1517.
- Pamikar, N; Siddiqi, N; Dev, G *et al.* Comparison of polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* from paraffin-embedded tissue sections in extrapulmonary tuberculosis. J Infect Dis Antimicrob. 2003; 20:61-68.
- Bates, P; Sanderson, G; Holgate, S *et al.* A comparison of RT-PCR, in-situ hybridisation and in-situ RT-PCR for the detection of rhinovirus infection in paraffin sections . Journal of Virological Methods. 1997;67(2):153-160.
- Jiménez, G; Villalobos, M; Jimenez, E *et al.* Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica. 2007;1(1)10-19.
- Noordhock, G; Kolk, A & June, G. Sensitivity and Specifity of PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a Blind Comparison Study Among Seven Laboratories. Journal of Clinical Microbiology. 1994;32 (2): 277-284.

Correspondencia

Ing. María José Suárez

Centro de Investigaciones en Hematologías Anormales y Trastornos Afines (CIHATA),
UCR.

Laboratorio de Histología, Facultad de Medicina, UCR

majosu@gmail.com

Dr. José Luis Quirós

Laboratorio de Histología, Facultad de Medicina, UCR