

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE PCR Y ADA EN DERRAME
PLEURAL DE PACIENTES PRESUNTIVOS DE TUBERCULOSIS

Por

JUDITH FUENTES LEÓN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología

Octubre, 2012

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE PCR Y ADA EN
DERRAME PLEURAL DE PACIENTES PRESUNTIVOS DE TUBERCULOSIS**

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño

Presidente

Dr. Carlos Hernández Luna

Secretario

Dra. María del Pilar Carranza Rosales

Vocal

Dr. Roberto Mercado Hernández

Vocal

Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado

Vocal

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE PCR Y ADA EN
DERRAME PLEURAL DE PACIENTES PRESUNTIVOS DE TUBERCULOSIS**

Por

Q.B.P. Judith Fuentes León

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño. En el centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría de la Dra. Ma. del Pilar Carranza Rosales. En la Unidad Médica de Altas Especialidades No 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social, con la asesoría de la Dra. Nancy E. Guzmán Delgado y en el Departamento de Control Microbiológico del Laboratorio Estatal de Salud.

Dra. Licet Villarreal Treviño

Director Interno

Dra. María del Pilar Carranza Rosales

Director Externo

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Tuberculosis	3
1.1.1 Tuberculosis, situación actual.....	3
1.1.2 Tuberculosis Pleural.....	3
1.1.3 Técnicas diagnósticas.....	4
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	7
3.1. Objetivo General	7
3.2. Objetivos Particulares.....	7
4. ANTECEDENTES	8
4.1. Tuberculosis.	8
4.2. Tuberculosis Extrapulmonar.	9
4.3. Líquido Pleural	10
4.4. Tuberculosis Pleural (TBP).....	10

4.5. Métodos de diagnóstico para TBP.....	11
5. MÉTODOS	13
5.1. Selección de muestras de estudio.	13
5.2. Cultivo de Líquido Pleural.	13
5.3. Análisis Molecular.....	15
5.3.1. Extracción de DNA genómico.....	15
5.3.2. Ensayo de PCR.	16
5.4. Cuantificación de niveles de ADA	20
5.4.1. Reactivos y procedimiento para lectura de ADA.....	21
5.4.2. Cálculos para cuantificación de ADA.....	23
5.5. Análisis Microscópico.	24
5.5.1. Citologías-Biopsias.	24
5.5.2. Tinción de Ziehl-Neelsen.	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Características bacteriológicas.	26
6.2. Tinción de bacilos ácido-alcohol resistentes.	27
6.3. Características Histopatológicas.....	28
6.4. Medición enzimática de Adenosin Deaminasa.....	29
6.5. PCR.....	31
6.6. Relación estadística entre pruebas.....	33
6.6.1 Dependencia de ADA con otras pruebas.....	33
6.6.2. Dependencia de PCR con otras pruebas.	35
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
8.1. Conclusiones.....	51
8.2. Recomendaciones	52
LITERATURA CITADA	53
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	56

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Licet Villarreal Treviño. Asesora de mi tesis. Así como a la Dra. María del Pilar Carranza Rosales por sus consejos, su paciencia y sus acertadas observaciones

A los Dr. Nancy Elena Guzmán Delgado, Dr. Roberto Mercado Hernández, y Dr. Carlos Hernández Luna por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A la Unidad Médica de Altas Especialidades # 34 del IMSS (UMAE 34) y al Centro de Investigación Biomédica del Norte del IMSS (CIBIN) por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

Al Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud, especialmente al QCB Alejandro Morales Vargas y al QBP Víctor Manuel Velázquez Moreno, por sus enseñanzas y apoyo.

A la química Verónica Ángeles Morales y Dr. José Luis Soto-Hernández del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, por la capacitación y ayuda para la cuantificación enzimática.

Al Sr. José Luis Bañaes Méndez del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por su valiosa asesoría para la cuantificación de Adenosina Deaminasa.

DEDICATORIA

A mis padres Ricardo y Elena por el apoyo moral que siempre me han brindado.

A mis compañeros del departamento de Patología de la UMAE # 34; Lorena, José Luis, Beatriz, Felicitas, Javier, Arturo, Griselda, Ángel, y la Dra. Diana González Cabello, ya que sin su apoyo y ayuda no sería posible este proyecto.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Oligonucleótidos para la amplificación del gen IS6110 en <i>M. tuberculosis</i>	17
2. Condiciones de amplificación por PCR para el gen IS6110. con los primers externos ISEX-1/ISEX-2.....	18
3. Condiciones de amplificación por PCR para el gen IS6110. con los primers internos ISIN-1/ISIN-2.....	19
4. Ensayo para cuantificar los niveles de ADA.....	22
5. Resultados de cuantificación de ADA en 95 muestras de líquido pleural.....	30
6. Resultados para los estudios ADA, cultivo, BAAR y biopsia en reportes positivos para PCR de líquido pleural.....	32
7. Valores de la prueba de Chi-cuadra entre las pruebas ADA y BAAR.....	34
8. Valores de la prueba de Chi-cuadrada entre las pruebas PCR y BAAR.....	36
9. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable cultivo.....	37
10. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable PCR.....	38
11. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable BAAR.....	39
12. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable biopsia.....	40

13.	Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable cultivo.....	41
14.	Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable BAAR.....	42
15.	Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable biopsia.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Principio de la técnica de Giusti.....	20
2. Resultados de líquidos pleurales cultivados en medios Lowstein-Jensen, Stonebrick, y en el medio MGIT 960 del sistema BACTEC.....	26
3. Reportes de tinción ácido-alcohol resistente para líquidos pleurales.....	27
4. Diagnóstico del estudio patológico resumido en 5 categorías.....	28
5. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable cultivo.....	37
6. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable PCR.....	38
7. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable BAAR.....	39
8. Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable biopsia.....	40
9. Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable cultivo.....	41
10. Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable BAAR.....	42
11. Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable biopsia.....	43

NOMENCLATURA

°C	Grado centígrado
μl	Microlitro
Abs	Absorbancia
ADA	Adenosina deaminasa
bp	(<i>base pairs</i>) pares de bases
conc	Concentración
CTAB	(<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>) bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DNA	(<i>Desoxyribonucleic acid</i>) ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleótido trifosfato
g	Gramos
Hb	Hemoglobina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Kb	Kilobases
L	Litros
M	Concentración molar
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
N	Concentración normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
s	Segundo
SDS	Lauril sulfato de sódio

T.A.	Temperatura ambiente (°C)
TB	Tuberculosis
TE	Buffer Tris y EDTA
UI	Unidades internacionales
UMAE	Unidad médica de altas especialidades
uv	Ultravioleta
WMA	(<i>World Medical Association</i>) Asociación Médica Mundial

RESUMEN

La tuberculosis pleural se considera una manifestación de tuberculosis primaria y es la segunda presentación extrapulmonar más común de esta enfermedad.

Aparte de tuberculosis, un derrame pleural puede presentarse en casos de infecciones diversas, de obstrucción linfática y enfermedades neoplásicas.

La detección de *Mycobacterium tuberculosis* en el líquido pleural es clave para determinar o descartar la patogenia de un derrame pleural. Actualmente se realiza por medio de cultivo y por tinción de Ziehl Neelsen, el primero, es altamente específico pero requiere de más de 30 días para arrojar resultados concluyentes y la tinción es rápida, pero carece de especificidad.

En el presente estudio se llevó a cabo la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la determinación de Adenosin Deaminasa (ADA) en líquido pleural de 95 pacientes del hospital de Especialidades IMSS # 34 y que presentaron derrame pleural, para demostrar si estas pruebas son eficientes y rápidas para detectar la presencia y/o infección de *M. tuberculosis* en comparación con las pruebas tradicionales.

De los 95 líquidos pleurales se obtuvieron resultados positivos en 26 ensayos de PCR y 9 por determinación de ADA, en contraste con las técnicas tradicionales donde en solo 2 líquidos pleurales se observó crecimiento en cultivo, 6 demostraron presencia del mycobacilo por tinción de BAAR y ninguna biopsia y/o citología reportó presencia de *M. tuberculosis*.

Se observó dependencia significativa de las pruebas PCR y ADA con la tinción de BAAR mediante tablas cruzadas y el cálculo de la distribución Chi-cuadrada, no así con las otras pruebas tradicionales (cultivo y biopsia).

Nuestros resultados demuestran que, ni la prueba de PCR ni la de ADA deben ser empleadas como único estudio que sustituya a los métodos tradicionales de diagnóstico ya establecidos, pero pueden auxiliar a complementar el diagnóstico de tuberculosis pleural.

ABSTRACT

The pleural tuberculosis is considered a primary manifestation of the disease and is the second common extrapulmonary presentation of this illness. Aside from tuberculosis, a pleural discharge can be presented in cases of diverse infections, like lymphatic obstruction and neoplastic illness

The detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural liquid is a key to determine or to rule out the patogenicity of a pleural discharge. Nowadays is carried out through bacterial culture and by Ziehl Neelsen staining, the first one, is highly specific but requires more than 30 days to throw conclusive results and the coloration is fast, but lacks specificity.

In the present study the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) and the measure of Adenosin Deaminasa (ADA) enzyme level, were tested in pleural liquid of patients of the hospital of Specialties IMSS # 34, who presented pleural effusion, to show if these tests are efficient and fast in the detection of presence and/or infection of *M. tuberculosis* in comparison with traditional tests.

Of the 95 pleural fluids we had positive PCR assays in 26 cases and in 9 for ADA determination, in contrast to traditional techniques where only 2 pleural fluid culture growth was observed, 6 showed presence of AFB by staining mycobacilli and no biopsy and/or cytology reported presence of *M. tuberculosis*.

Significant dependence was observed for PCR and ADA tests with AFB staining by cross boards and Chi-square distribution, but not with the other traditional tests (culture and biopsy).

Our results demonstrate that neither the PCR nor ADA should be used as the only study to replace traditional diagnostic methods already established, but may help to complement the diagnosis of pleural tuberculosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis

1.1.1 Tuberculosis, situación actual.

La tuberculosis (TB) es la causa de muerte más frecuente en todo el planeta debida a un agente infeccioso. Es una enfermedad infecto contagiosa causada por *M. tuberculosis*, la cual afecta más comúnmente a los pulmones pero puede afectar otras partes del organismo; las formas más frecuentes de TB extrapulmonar son la pleural, ganglionar, meníngea y ósea. Se transmite de persona a persona a través de gotas o aerosoles generados en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa. Según La Organización Mundial de la Salud, un tercio de la población se encuentra infectado y no presentan síntomas ni signos asociados con esta infección, pero tiene el riesgo de desarrollar tuberculosis porque el bacilo persiste durante toda la vida (OMS, 2009).

1.1.2 Tuberculosis Pleural.

En la tuberculosis pleural se produce un acúmulo de líquido en el espacio pleural, sin embargo, otras causas de derrame pleural pueden ser obstrucción linfática congénita o adquirida, enfermedades neoplásicas, infecciones granulomatosas y necrotizantes, así como enfermedades de la colágena. Todo derrame pleural debe ser puncionado para conocer su composición histoquímica y patológica en búsqueda de células malignas, de enfermedad primaria o metastásica. La biopsia de líquido pleural debe realizarse al estudiar un derrame pleural, especialmente en enfermedades como cáncer y tuberculosis (Epstein *et al.*, 1987).

1.1.3 Técnicas diagnósticas.

El diagnóstico de la TB pulmonar y extrapulmonar es principalmente bacteriológico, mediante el cual se demuestra la presencia del bacilo tuberculoso. A veces, el diagnóstico de la tuberculosis puede resultar difícil por la inespecificidad de la observación microscópica y los largos periodos de tiempo que requiere el cultivo de la micobacteria, además de que en pacientes que padecen otras infecciones, la presentación de la enfermedad puede ser inespecífica y atípica.

1.1.3.1 Métodos diagnósticos tradicionales para derrame pleural.

En el caso de derrame pleural, los métodos de diagnóstico disponibles son; el estudio anatómo-patológico de la biopsia pleural, cultivo de líquido pleural, cultivo de biopsia pleural percutánea o a cielo abierto y citología del líquido en busca de bacilos ácido-alcohol resistentes. De estos métodos, el más sensible es el cultivo de biopsia pleural, con el inconveniente que para obtener el resultado se debe esperar de 30 a 40 días y el más rápido y económico es la tinción de Ziehl-Neelsen, pero carece de sensibilidad (Rojas B, Yi A, Accinelli R; 1993).

Por lo general, las decisiones clínicas y terapéuticas necesitan tomarse en un periodo menor al de un cultivo o análisis, por lo tanto, es necesario emplear técnicas que sean sensibles y rápidas para confirmar y/o descartar la etiología de un derrame pleural.

1.1.3.2 Técnicas de rápida detección.

Para una rápida detección de *M. tuberculosis* se han desarrollado nuevas técnicas con el objetivo de reducir el tiempo requerido para su diagnóstico (Lima *et al.*, 2003). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología utilizada para el diagnóstico de tuberculosis con especificidad de 78% a 100%, dependiendo del área del genoma que es amplificado y la técnica usada para la extracción de DNA (De Wit *et al.*, 1992). De la misma manera, la determinación de ADA en líquido pleural es

indicador de tuberculosis pleural con un 100% de sensibilidad y 75% de especificidad (Rojas *et al.*, 1993). Es por lo anterior que propusimos aplicar estas técnicas para detección de TB pleural y así comparar con las técnicas actualmente empleadas en el área hospitalaria del Noreste de México.

2. HIPÓTESIS

La prueba de adenosin deaminasa (ADA) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden ser pruebas sensibles y de rápida interpretación que complementen el diagnóstico de Tuberculosis Pleural.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Implementar la detección de ADN de *M. tuberculosis* mediante PCR y cuantificación de adenosin deaminasa (ADA) en líquido pleural de pacientes sospechosos de tuberculosis pleural.

3.2. Objetivos Particulares

- 3.2.1. Implementar la técnica de PCR en líquido pleural de pacientes del servicio de neumología de la UMAE 34 del IMSS, que permita detectar ADN del gen *IS6110*, el cual es específico de *M. tuberculosis*.
- 3.2.2. Estandarizar la detección de ADA por el método de Guisti.
- 3.2.3. Evaluar la utilidad diagnóstica de la determinación de ADA en líquido pleural para el diagnóstico de TBP.
- 3.2.4. Valorar mediante un estudio comparativo los resultados de PCR y niveles de ADA, con los resultados de la biopsia por microscopía, citología y cultivo.

4. ANTECEDENTES

4.1. Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es la causa de muerte más frecuente en todo el planeta debida a un agente infeccioso (Raviglione and Luelmo, 1996). Es una enfermedad infectocontagiosa causada por *M. tuberculosis*, la cual afecta más comúnmente a los pulmones. Se transmite de persona a persona a través de gotas o aerosoles generados en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa. La mayor parte de los individuos infectados no presentan síntomas ni signos asociados con esta infección, pero tienen el riesgo de desarrollar tuberculosis porque el bacilo persiste durante toda la vida; esto es muy importante, ya que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada por este tipo de micobacteria. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son, tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna (Arciniegas and Orjuega, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que a nivel mundial un tercio de la población está infectada por *M. tuberculosis*; cada año se estima una ocurrencia cercana a los 8 millones de casos nuevos y 1.5 millones de defunciones por tuberculosis (Diario Oficial. Secretaria de Salud, 2005). En México se registran a la fecha alrededor de 2000 muertes y 15,000 nuevos casos al año donde la ocurrencia aumenta en grupos específicos de la población (Secretaria de Salud, 2007).

Hasta abril de 2009 la OMS reportó 2, 578,939 de nuevos casos a nivel mundial, de los cuales 11,531 casos correspondieron a México (OMS, 2009), además, es importante mencionar que en las grandes ciudades suelen presentarse mayor número de casos, esto, debido a los altos niveles de migración, además de que muchos de estos pacientes vienen de otras ciudades a ser tratados en los centros hospitalarios de las mismas (González, 2007).

Sin embargo, a pesar de los enormes esfuerzos que se han llevado a cabo desde hace varios años para combatir la tuberculosis, los programas implementados en todo el mundo, incluyendo México, se han visto detenidos en parte debido a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* drogo-resistentes, tales como las cepas multirresistentes (MDR-tuberculosis) las cuales son resistentes al menos a dos de los agentes antifímicos más potentes y de primera línea (isoniazida y rifampicina) o las extremadamente resistentes (XDR-tuberculosis), que resisten a cualquier fluoroquinona y al menos a uno de los tres fármacos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina).

Se estima que existen alrededor de 450,000 personas infectadas con esta clase de micobacterias. Respecto a la resistencia bacteriana, México ocupa el primer lugar en toda América (13%) (Reporte Hospital General de México, 2004). Ante esta realidad, en nuestro país se cuenta con una serie de indicadores clave para estimar la carga de tuberculosis, la cual sigue siendo relativamente elevada en términos de incidencia (23 casos/100000 habitantes/año) (González, 2007).

4.2. Tuberculosis Extrapulmonar.

A pesar de que el pulmón es el órgano blanco de la tuberculosis, cualquier órgano y sistema puede verse afectado, las formas más frecuentes de TB extrapulmonar son la pleural, ganglionar, meníngea y ósea; y es la tuberculosis pleural, la que requiere de mayor pericia diagnóstica (Panlo and Tiberio, 2007). El diagnóstico de la TB pulmonar y extrapulmonar es principalmente bacteriológico, mediante el cual se demuestra la presencia del bacilo tuberculoso, sin embargo, el diagnóstico de la tuberculosis puede resultar difícil por la inespecificidad de la observación microscópica y los largos periodos de tiempo que requiere el cultivo de la micobacteria, además de que en pacientes que padecen otras infecciones, la presentación de la enfermedad puede ser inespecífica y atípica (Lima *et al.*, 2003). Debido a que este proyecto se enfocará en tuberculosis pleural, lo siguiente se referirá a este padecimiento.

4.3. Líquido Pleural

El líquido pleural es el fluido en el espacio pleural que sirve como lubricante entre la pleura visceral y parietal (Villena *et al.*, 2006). En caso de enfermedad se produce acúmulo de líquido en el espacio pleural. Otras causas de derrame pleural, además de la tuberculosis, pueden ser obstrucción linfática congénita o adquirida, enfermedades neoplásicas, infecciones granulomatosas y necrotizantes, así como, enfermedades de la colágena (Reporte Hospital General de México, 2004). Por lo anterior, todo derrame pleural debe ser puncionado para conocer su composición histoquímica y patológica en búsqueda de células malignas, de enfermedad primaria o metastásica, por lo tanto, es necesaria la biopsia de líquido pleural especialmente en enfermedades como cáncer y tuberculosis (Epestein *et al.*, 1987).

4.4. Tuberculosis Pleural (TBP)

Se define como la tuberculosis de las membranas serosas que cubren la cavidad torácica y que rodean los pulmones (Valdez *et al.*, 1998). La presentación clínica de la TBP puede ser leve o severa, con dolor en el pecho, tos no productiva, fiebre, disnea, sudoración nocturna y pérdida de peso (Khtami, 2000). Se considera una manifestación de tuberculosis primaria y se relaciona con individuos sanos pero susceptibles, que viven o trabajan en medios superpoblados o en condiciones socio-económicas bajas (Epestein *et al.*, 1987; Haa, 2000). La hipótesis acerca de la patogénesis de la TBP es que las lesiones caseosas en el pulmón se rompen hacia el espacio pleural en un lapso de 6 a 12 semanas después de la infección primaria (Raviglione and Luelmo, 1996). Los antígenos de *M. tuberculosis* alcanzan al espacio pleural e interactúan con los linfocitos T previamente sensibilizados hacia esta bacteria, resultando en una reacción de hipersensibilidad retardada y en la acumulación de líquido, el cual es generalmente un exudado que puede ser sanguinolento y que comúnmente contiene poca cantidad de bacilos (Khatami, 2000), esta última característica hace que muchas veces el diagnóstico de TBP sea difícil.

4.5. Métodos de diagnóstico para TBP

Los métodos de diagnóstico disponibles para TBP son el estudio anatómico-patológico de la biopsia pleural, cultivo de líquido pleural, cultivo de biopsia pleural percutánea o a cielo abierto y citología del líquido pleural en busca de bacilos ácido-alcohol resistentes. De estos métodos, el más sensible es el cultivo de biopsia pleural, con el inconveniente que para obtener el resultado se debe esperar de 30 a 40 días (Raviglione and Luelmo, 1996).

El diagnóstico en laboratorio para tuberculosis pleural se basa en la tinción de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido-alcohol resistentes. Esta tinción es rápida y económica, pero carece de sensibilidad; por otro lado, como se mencionó anteriormente, el cultivo, altamente sensible, toma un largo periodo para dar resultados y por lo general, las decisiones clínicas y terapéuticas necesitan tomarse en un tiempo menor (Lima *et al.*, 2003).

Para una rápida detección de *M. tuberculosis* se han desarrollado nuevas técnicas con el objetivo de reducir el tiempo requerido para su diagnóstico (Lima *et al.*, 2003).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de DNA con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de ciclos repetidos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima DNA polimerasa termoestable (Rodríguez y Barrera, 2004). *M. tuberculosis* contiene en su cromosoma la secuencia de inserción IS6110 la cual pertenece a la familia móvil IS3 del elemento de secuencia de inserción enterobacterial (Vera-Cabrera *et al.*, 2001). Esta inserción está presente en otras especies del complejo *M. tuberculosis* pero ausente en mycobacterias que no están tan estrechamente relacionadas. La secuencia de inserción IS6110 es utilizada por los laboratorios que desarrollan sistemas de detección específica de TB por amplificación de ácidos nucleicos, debido a que existen múltiples copias y es fácil de estandarizar (Zenteno, 2003). Desde la invención de la técnica de PCR, se ha utilizado para la detección de *M. tuberculosis* (Rodríguez *et al.*, 2000). Los ensayos moleculares de PCR permiten una identificación rápida y

específica con un límite inferior de detección que varía de 1 a 100 bacilos por mililitro de muestra, esta es una ventaja si tomamos en cuenta que el análisis microscópico tiene un límite inferior de detección de 10^4 bacilos por mililitro de muestra mejorando la sensibilidad entre el 35 al 39 % con respecto a los análisis histopatológicos y reduciendo el tiempo del diagnóstico de 36 a 72 horas (Coetsier *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000). La detección del DNA de *Mycobacterium* por PCR en muestra clínicas es una actividad promisorio para el rápido tratamiento de las infecciones tuberculosas (Nagesh and Babu, 2001).

Otros métodos como la medición de los niveles de actividad de la adenosin deaminasa (ADA) han demostrado ser un parámetro sensible y específico para la tuberculosis pleural en circunstancias especiales como en las regiones con alta prevalencia de tuberculosis (Villegas y Labrada, 2000). La ADA, es una enzima derivada del metabolismo de las purinas, cuyos niveles se encuentran elevados en los exudados provenientes de pleuresías, peritonitis, meningitis tuberculosas y suero de enfermos con tuberculosis activa (Giusti, 1974). En 1973 Piras y Gakis sugieren por primera vez que en las meningitis tuberculosas existe una elevación en la actividad de ADA en comparación de las meningitis bacterianas, virales y otros grupos de enfermedades (Zuñiga and Soto, 2005). La determinación de adenosin deaminasa se ha demostrado en altos niveles en el caso de pleuresías tuberculosas, mientras que en las neoplasias estos son bajos (De Wit *et al.*, 1992). La producción de esta enzima refleja la presencia de monocitos y linfocitos T activados (Khatami, 2000).

5. MÉTODOS

5.1. Selección de muestras de estudio.

Se utilizaron 95 líquidos pleurales de derechohabientes del IMSS referidos al servicio de neumología de la UMAE #34 para protocolo de estudio por derrame pleural, con diagnóstico presuntivo de tuberculosis pleural, en el periodo comprendido del 1 de enero al 31 de julio del 2010.

La población de pacientes del servicio de neumología de la UMAE pertenecía a los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Coahuila, Zacatecas y San Luis Potosí.

Los líquidos pleurales se obtuvieron por toracocentesis, con todas las medidas quirúrgicas y de control que se emplean en el departamento de neumología y se colocaron en frasco estériles de boca ancha y sellada para evitar contaminación, posteriormente fueron enviados al área de patología y al área de bacteriología, en el laboratorio clínico del hospital. En el manejo de los líquidos pleurales fueron tomadas en consideración las medidas de bioseguridad estipuladas por la normatividad del IMSS.

5.2. Cultivo de Líquido Pleural.

Los cultivos se realizaron en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 del Laboratorio Estatal de la Secretaría de Salud.

Se cultivó en medios Löewestein-Jensen y Stonebrink, por siembra directa y un segundo cultivo del líquido pleural previamente descontaminado en solución de NAOH al 4% (relación muestra/NaOH, 1:2), agitado en vortex 20 segundos, centrifugado a 6000 RPM durante 15 minutos y decantado a dejar 3 ml en tubo. Este mismo lavado se repitió con 20 ml de agua estéril.

De las muestras tanto directa como descontaminada se tomaron 0.5 ml y se añadieron a un tubo de medio BD-MGIT[®] (Becton-Dickison[®]), al cual se le agregaron

previamente 0.8 ml de solución OADC (suplemento que consiste en ácido oleico, albúmina bovina, dextrosa y catalasa) y PANTA[®] (mezcla de antibióticos Polimixina B, Amfotericina B, ácido nolidíxico, Trimetropina y Azocilina) y se mezclaron por agitación suave. Del medio BD-MGIT[®] se tomaron cuatro gotas para la siembra en los medios sólidos, y una última gota se destinó para frotis y tinción en laminilla.

La primera observación se hizo a las 24-72 horas para detectar contaminación de flora asociada. Las siguientes revisiones se realizaron cada 7 días hasta completar 56 y se realizó un informe del crecimiento si este se presentaba. A los 63 días se hizo la última revisión y el informe definitivo, ya sea positivo o negativo. Las colonias típicas de *M. tuberculosis* se observaron con su morfología típica; seca, rugosas y con una leve coloración marfil.

El tubo de medio MGIT se colocó en el sistema lector/incubadora BD-BACTEC MGIT 960[®] (software versión V3.05A), el cual realizó lectura continua de actividad metabólica en el medio durante 42 días. En caso de lectura positiva en el sistema BD-BACTEC, se procedió a cultivar 4 gotas del medio MGIT en medios sólidos para confirmar presencia de Mycobacterias o contaminación por otros microorganismos.

Una bitácora de procesos se llevó a lo largo de los 63 días para cada muestra cultivada.

5.3. Análisis Molecular.

5.3.1. Extracción de DNA genómico.

Las muestras de líquido pleural se homogenizaron y se tomaron 500 µl en un tubo eppendorf, al cual se le añadió 450 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, 0.5 mM EDTA , 1% Tween-20) mas 50 µl de Proteinasa K (10 mg/ml), se mezcló por inversión 20 veces y se incubó durante 24 horas a 37°C en agitación, al terminar las 24 horas, se inactivó la proteinasa K incubando la muestra durante 10 minutos a 95°C.

Al terminar este proceso, se adicionaron 300 µl de TE 1X y 100 µl de NaCl 5M, se agitó por inversión 20 veces, se añadieron 80 µl de CTAB previamente calentado a 65°C y mezclado en vortex hasta obtener consistencia lechosa y se dejó incubar por 10 minutos a 65°C.

Se adicionó 700 µl de solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en vortex por 10 segundos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Terminado el centrifugado, con una micropipeta en posición de 750 µl se retiró cuidadosamente la fase acuosa-superior y se colocó en un tubo eppendorf nuevo al cual se le añadió 500 µl de isopropanol, se mezcló en vortex y se incubó a -20°C durante toda la noche.

Una vez descongelado se centrifugó el tubo a 12000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet de DNA con 1 ml de etanol al 70% frio. El sobrenadante se eliminó y el DNA fue resuspendido en 30 µl de buffer TE 1X, se homogenizó la suspensión y se determinó la concentración de DNA en espectrofotómetro.

5.3.2. Ensayo de PCR.

El análisis molecular se realizó mediante una reacción anidada de PCR para detectar y amplificar el gen *IS6110* el cual es específico de *M. tuberculosis*. Para ello se utilizaron secuencialmente, Buffer 10X-PCR (Sigma) que ya incluye MgCl₂, la enzima Red-*Taq* DNA polimerasa (Sigma), y dNTPs (Invitrogen). Los iniciadores utilizados en los ensayos de PCR fueron dos pares de primers, ISEX-1/ ISEX-2 en una primera PCR e ISIN-1/ISIN-2 para la PCR anidada, las características de estos se muestran en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación optimizadas se muestran en las Tablas 2 y 3.

Los productos amplificados se analizaron en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Se utilizaron marcadores de peso molecular para determinar el tamaño esperado de los amplicones.

Tabla 1

Oligonucleótidos para la amplificación del gen *IS6110* en *M. tuberculosis*.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplicón
<i>IS6110</i>	ISEX-1	5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'	315 pb
	ISEX-2	5'-TCAGCCGCGTCCACGCCGCCA-3'	
	ISIN-1	5'-AACGGC TGATGACCAA ACTC-3'	155 pb
	ISIN-2	5'-GGTGAGGTCTGCTACCCACA-3'	

Tabla 2

Condiciones de amplificación por PCR para el gen *IS6110*.

Con los primers externos ISEX-1/ISEX-2

Gen	Reacción		Ciclo (X 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>IS6110</i>	Agua desionizada	a 25 μ l	96° C 6 min	94°C 30 seg	60°C 30 seg	72° C 30 seg	72°C 10 min
	Amortiguador PCR 10X	2.5 μ l					
	dNTP's mix (1.5 mM c/u)	4.0 μ l					
	Primer ISEX-1 (5 μ M)	1.0 μ l					
	Primer ISEX-2 (5 μ M)	1.0 μ l					
	RedTaq polimerasa	1.0 μ l					
	DNA templado	1.0 μ l					

Tabla 3

Condiciones de amplificación por PCR para el gen *IS6110*.
con los primers internos ISIN-1/ISIN-2

Gen	Reacción		Ciclo (X 35)				
	Compuesto	Concentración final	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>IS6110</i>	Agua desionizada	a 25 µl	96° C 6 min	94°C 30 seg	60°C 30 seg	72° C 30 seg	72°C 10 min
	Amortiguador PCR 10X	2.5 µl					
	dNTP's mix (1.5 mM c/u)	4.0 µl					
	Primer ISIN-1 (5 µM)	1.0 µl					
	Primer ISIN-2 (5 µM)	1.0 µl					
	RedTaq polimerasa	1.0 µl					
	DNA templado	1.0 µl					

5.4. Cuantificación de niveles de ADA

La determinación de ADA se efectuó por la técnica de Giusti (Giusti, 1974). Con esta técnica la ADA transforma a la adenosina en inosina y amoniac; el amoniaco reacciona con hipoclorito de sodio y fenol a 37° C utilizando nitroprusiato de sodio en medio alcalino como catalizador para formar indofenol, el cual da un intenso color azul que se mide espectrofotométricamente a 628 nm. (Figura 1).

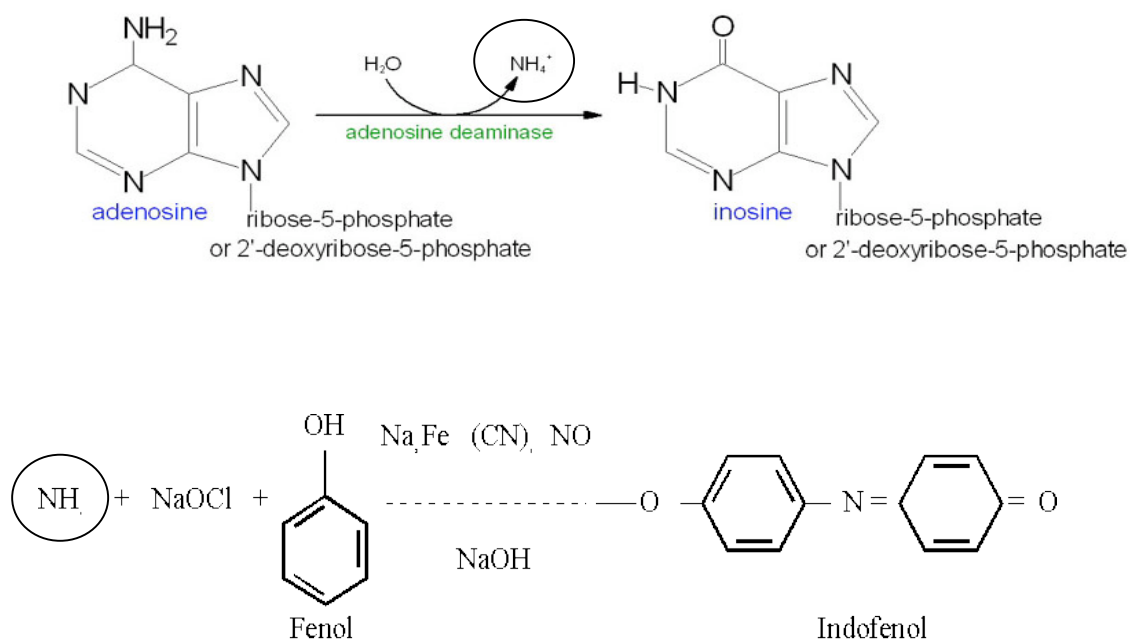


Figura 1. Principio de la técnica de Giusti. La Adenosina Deaminasa transforma la adenosina en inosina liberando amoniaco, el cual reacciona con hipoclorito y fenol en medio alcalino y produce indofenol..

5.4.1. Reactivos y procedimiento para lectura de ADA.

Para su cuantificación, el líquido pleural se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos y el decantado se separó y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Se preparó buffer de fosfatos 50 mM con 4.73 gr. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 4.21 gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ diluidos a 1 L con agua destilada y llevado a pH 6.5. La solución standard de sulfato de amonio se preparó con 0.5 ml. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM (1.982 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ puro y enrasado a 1 L con agua destilada) diluido en 100 ml de buffer de fosfatos.

De las muestras descongeladas se tomaron 50 μl y se adicionaron en 1 ml de una solución de adenosina 21 mM, pH 6.5 (Sigma). La mezcla se incubó a 37°C por una hora y la reacción se detuvo mediante la adición de 3 ml. de fenol-nitroprusiato (10 gr de fenol y 50 mg. de Nitroprusiato de sodio y agua destilada a completar 1 L) y 3 ml de solución de hipoclorito de sodio alcalino (125 ml de NaOH 1N mas 6.4 ml de hipoclorito comercial enrasados a 1 L con agua destilada). Se cubrieron los tubos de vidrio con Parafilm[®] y se agitaron por inversión. La mezcla se incubó a 37°C por 30 min y se cuantificó la cantidad de amonio liberado por la ADA utilizando un espectrofotómetro a longitud de onda de 628 nm.

Para determinar las unidades de ADA en las muestras, se prepararon soluciones blancos de reactivos, de la muestra y de adenosina así como un estándar de sulfato de amonio, en estas soluciones se siguió el mismo procedimiento que el ensayo de las muestras y se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Ensayo para cuantificar los niveles de ADA.

Reactivos.	Blanco de Reactivo	Standard	Blanco de Adenosina	Blanco de Muestra	Muestra
Buffer de fosfatos	1.0 ml	–	–	1.0 ml	–
Solución de adenosina	–	–	1.0 ml	–	1.0 ml
Solución standard de sulfato de amonio	–	1.0 ml	–	–	–
Muestra (líquido pleural)	–	–	–	0.05 ml	0.05 ml
Cubrir tubos con Parafilm [®] , mezclar e incubar por 1 h. a 37 °C.					
Solución de fenol-nitroprusiato	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml
Solución de hipoclorito alcalino	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml
Mezclar e incubar por 30 min. a 37 °C. Leer las absorbancias contra agua destilada.					

5.4.2. Cálculos para cuantificación de ADA.

El ensayo se realizó por triplicado para las muestras de líquido pleural y por duplicado para los blancos y el standard. Para los cálculos se obtuvo la media de las absorbancias para cada caso.

Se calcularon las siguientes diferencias:

Abs de muestra – Abs blanco de muestra = A

Abs blanco de Adenosina – Abs blanco de reactivo = B

Abs standard – Abs blanco de reactivo = C

Con los resultados obtenidos, se realizó la siguiente ecuación para determinar la actividad volumétrica.

$$\text{Unidades de ADA} = \frac{A - B}{C} \times 50 \text{ [UI]}$$

Se consideró como positivo los valores de ADA mayores a 27 UI.

5.5. Análisis Microscópico.

5.5.1. Citologías-Biopsias.

Se realizó corroboración del diagnóstico por parte del personal médico del departamento de Anatomía Patológica de la UMAE 34, para evaluar la morfología celular, hallazgo de *M. tuberculosis*, el proceso inflamatorio de fondo y descartar lesión neoplásica.

Las muestras de líquido pleural se centrifugaron por 15 minutos a 3000 rpm y con el fondo celular se preparó un frotis en laminilla, esta, se fijó con etanol al 96 %. Una vez fijados, los frotis se tiñeron mediante la técnica de Papanicolau.

Para la tinción de Papanicolau, se realizaron los siguientes pasos:

1. Alcohol etílico 96° 15 seg.
2. Alcohol etílico 70° 15 seg.
3. Alcohol etílico 50° 15 seg.
4. Agua destilada 15 seg.
5. Hematoxilina de Harris 6 min.
6. Agua destilada 10 inmersiones.
7. Solución ácido clorhídrico 0,5% 1 - 2 inmersiones rápidas.
8. Agua destilada 15 seg.
9. Sol amoníaco 1,5% en alcohol 70°
10. Alcohol etílico 50° 15 seg.
11. Alcohol etílico 70° 15 seg.
12. Alcohol etílico 96° 15 seg.
13. O G 6 (*orange 6*) 2 min.
14. Alcohol etílico 96° 10 inmersiones.
15. Alcohol etílico 96° 10 inmersiones.
16. EA 50 (Eosina amarilla) 3 min.
17. Alcohol etílico 96° (10 inmersiones)

18. Alcohol etílico 100° (10 inmersiones)
19. Xilol (10 inmersiones)
20. Montaje: con resina sintética y cubrir con cubreobjetos de vidrio de la medida adecuada para cobertura total de la muestra.

5.5.2. Tinción de Ziehl-Neelsen (ZN).

Para la identificación microscópica de *M. tuberculosis*, los protocolos de tinción de los frotis para ZN se realizaron dos veces; una en el frotis realizado como parte del procedimiento del cultivo de muestra y la segunda en el departamento de anatomía patológica en donde se realizó la variante en frío.

Las técnicas realizadas se describen en los siguientes pasos:

Técnica clásica o “en caliente”.

1. Fucsina-fenicada 5 min.
2. Se calentó con mechero hasta la emisión de vapores (3-5 minutos).
3. Enjuague con agua corriente.
4. Decoloración con alcohol-ácido 7 min.
5. Azul de metileno 5 min.
6. Enjuague con agua corriente.
7. Montaje con aceite de inmersión y cubre-objeto .
8. Observación al microscopio con 100 x en 100 campos

Técnica “en frío”

1. Fucsina-fenicada en vaso Coplin 20 min.
2. Se decoloró con alcohol ácido 2 min.
3. Enjuague con agua corriente.
4. Se sumergió en azul de metileno 5 min.
5. Montaje con resina sintética y cubreobjetos.
6. Observación al microscopio con 100 x en 100 campos.

6. RESULTADOS

Se revisaron un total de 95 líquidos pleurales de pacientes (53 hombres y 42 mujeres) de edades de 10 a 91 años, que presentaron derrame pleural en el periodo de enero a octubre de 2010.

Los líquidos pleurales fueron enviados al Departamento de Anatomía Patológica por sospecha de tuberculosis pleural.

6.1. Características bacteriológicas.

De las 95 muestras cultivadas en los diversos medios y monitoreadas por el sistema BACTEC[®]; 90 (94.7 %) no presentaron crecimiento, 2 muestras (2.1%) presentaron crecimiento y 3 muestras (3.2%), fueron detectadas como positivas por el sistema BACTEC[®], pero no mostraron presencia de *Mycobacterium* en la resiembra en medios sólidos (Figura 2).

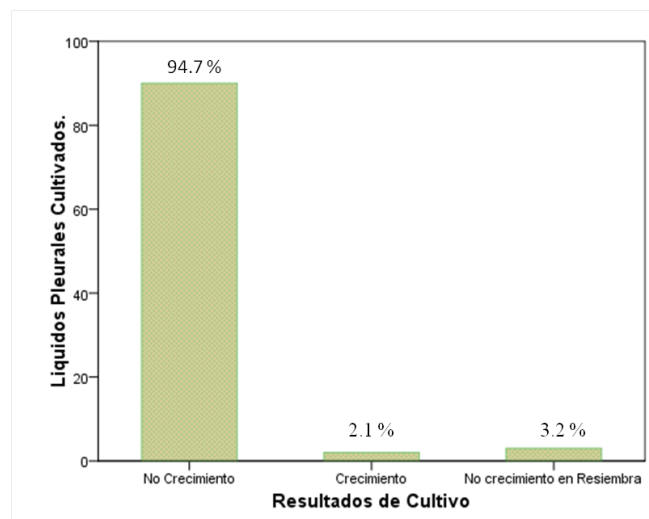


Figura 2; Resultados de líquidos pleurales cultivados en medios Lowstein-Jensen, Stonebrick, y en el medio MGIT 960 del sistema BACTEC.

6.2. Tinción de bacilos ácido-alcohol resistentes.

La tinción de líquidos pleurales con fucsina fenicada, alcohol ácido y azul de metileno, mostró la presencia del mycobacilo de la tuberculosis teñido de color rojo-rosa.

La tinción de Ziehl-Nielsen fue procesada y revisada por duplicado, ya que forma parte del protocolo de cultivo bacteriológico y protocolo de citologías en el departamento de Anatomía Patológica.

Al microscopio, en 100 campos con ampliación de 100 X, se observó el bacilo en 6 casos (6.3%) y el resto (93.7%) se reportaron como negativos (figura 3).

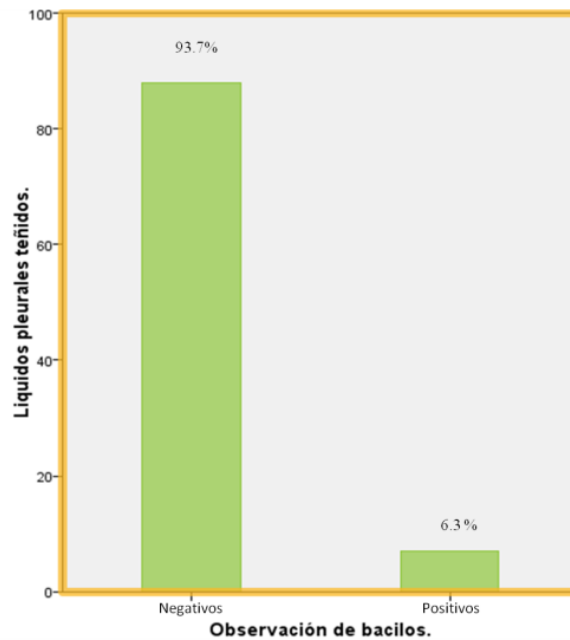


Figura 3; Reportes de tinción ácido-alcohol resistente para líquidos pleurales.

6.3. Características Histopatológicas.

Las 95 muestras recolectadas, fueron teñidas con la técnica de papanicolau y observadas al microscopio por el personal médico de departamento de Anatomía Patológica.

Dada la diversidad diagnóstica con la que se contaba, se categorizaron los pacientes de acuerdo a diagnósticos obteniendo 5 categorías o grupos que a continuación se mencionan: alteraciones inflamatorias (56.8% del total), negativo para tuberculosis (18.9%), malignidad (12.6%), cambios reactivos en células mesoteliales (9.5%) y alteraciones en células linfoides (2.1%). Figura 4.

Cabe mencionar que ningún estudio histopatológico reportó presencia de *Mycobacterium*.

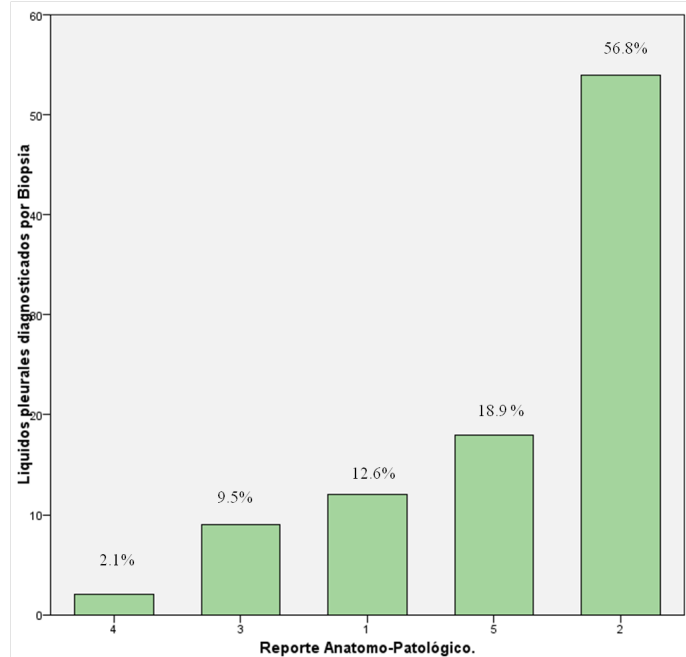


Figura 4: Diagnóstico del estudio patológico resumido en 5 categorías;

- 1.-Malignidad. 2.-Alteraciones inflamatorias. 3.-Cambios reactivos en células mesoteliales.
- 4.-Alteraciones en células linfoides y 5.-Otros/Negativo para TB.

6.4. Medición enzimática de Adenosin Deaminasa.

De los 95 casos, se excluyeron los resultados de las muestras que presentaban presencia de hemoglobina (17 de 95), ya que los eritrocitos humanos contienen gran cantidad de ADA que interviene con el ensayo.

Con la técnica de Guisti, se obtuvo un valor promedio de 14 UI de ADA en las 78 muestras libres de hemoglobina tomadas para el ensayo. Considerando 27 UI como valor de corte, el resultado del ensayo fue considerado positivo en 9 pacientes como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

Resultados de cuantificación de ADA en 95 muestras de líquido pleural.

Media	14 UI
≥ 27 UI	9
≤ 27 UI	69
Descartadas	17
TOTAL	95

6.5. PCR

El gen de inserción IS6110 para *M. tuberculosis* fue detectado en 28 muestras (29.5%) de los derrames pleurales colectados. Cada corrida de la técnica PCR fue realizada con controles positivos (ADN de cultivo puro) y controles negativos.

La tabla 6 muestra los 28 pacientes cuya prueba de PCR fue positiva para la presencia de la mycobacteria. Cabe mencionar que entre estos 28 resultados, se presentan solo 2 resultados de ADA superiores a 27 UI. Igualmente, entre los resultados PCR positivos, se encuentran los 2 casos donde si hubo el crecimiento en cultivo.

En cuanto a las biopsias, la mitad fue reportada como alteraciones inflamatorias, 3 resultados de malignidad y el resto de diverso diagnóstico.

De las 6 baciloscopías donde se reportó la presencia de *M. tuberculosis*, 5 de ellas se encuentran entre las muestras PCR positivas.

Tabla 6

Resultados para los estudios ADA, cultivo, BAAR y biopsia, de los 28 reportes positivos para PCR de líquido pleural.

Pacientes PCR positivo	ADA (UI)	Cultivo	Biopsia	BAAR
1	3	Negativo	5	Negativo
2	14	Negativo	3	Positivo
3	70	Negativo	5	Negativo
9	1	Negativo	3	Negativo
16	18	Negativo	2	Positivo
18	37	Positivo	2	Negativo
19	10	Negativo	2	Negativo
22	2	Negativo	3	Negativo
24	1	Negativo	5	Negativo
27	12	Negativo	2	Negativo
29	1	Negativo	1	Negativo
30	*Hb	Negativo	1	Negativo
31	*Hb	Negativo	2	Negativo
32	*Hb	Negativo	1	Negativo
33	*Hb	Negativo	2	Negativo
34	1	Negativo	2	Negativo
44	4	Negativo	2	Negativo
49	*Hb	Negativo	4	Positivo
62	7	Negativo	2	Negativo
66	*Hb	Negativo	2	Negativo
69	18	Negativo	2	Negativo
75	12	Negativo	2	Positivo
86	2	Negativo	2	Negativo
87	2	Negativo	5	Negativo
88	17	Positivo	5	Positivo
90	3	Negativo	5	Negativo
93	1	Negativo	3	Negativo
95	*Hb	Negativo	2	Negativo

*Hb: muestras descartadas para cuantificación de ADA debido a la presencia de hemoglobina.

Diagnóstico de biopsia: 1.-Malignidad. 2.-Alteraciones inflamatorias. 3.-Cambios reactivos en células mesoteliales. 4.-Alteraciones en células linfoides y 5.-Otros/Negativo para TB.

6.6 Relación estadística entre pruebas.

Para probar relaciones entre los resultados obtenidos o la independencia de las variables se utilizaron tablas cruzadas, compilando los resultados de cada estudio empleamos la distribución Chi-cuadrada para probar en última instancia si los resultados de las técnicas a probar son independientes a los resultados de los métodos tradicionales.

6.6.1 Dependencia de ADA con otras pruebas.

Para formar tablas cruzadas con la variable a probar (ADA) y con la Chi-cuadrada para la prueba de dependencia, se determinaron los rangos de ADA en cuartiles, de la siguiente manera:

1 = de 0 a 1 2 = de 2 a 3 3 = de 4 a 12 y 4 = de 13 a 100

Los valores de Chi-cuadrada, los grados de libertad y las probabilidades indican que hay dependencia significativa entre los valores de ADA con los resultados de la tinción de BAAR y que no existe entre la prueba de ADA con las técnicas de cultivo, biopsia, y PCR. Tabla 7.

Tabla 7

Valores de la prueba de Chi-cuadrada muestran que solo existió dependencia significativa entre la prueba ADA y BAAR (probabilidad ≤ 0.05)

Dependencia Prueba ADA	Valor de Chi-cuadrada	Grados de libertad	Probabilidad
CULTIVO	9.688	6	0.138
BIOPSIA	15.756	12	0.203
BAAR	9.361	3	0.025
PCR	2.841	3	0.417

6.6.2. Dependencia de PCR con otras pruebas.

A partir de los valores de Chi-cuadrada, los grados de libertad y las probabilidades se observó la dependencia significativa entre los valores de PCR con los resultados de la tinción de BAAR y que no existe entre la prueba a comparar con las técnicas de cultivo, biopsia, y ADA. Tabla 8.

Las figuras 5 a la 11 muestran las frecuencias de las tablas cruzadas (Tablas 9 a la 15) de la prueba ADA y PCR contra las otras técnicas.

Tabla 8.

Valores de la prueba de Chi-cuadrada muestran que solo existió dependencia significativa entre la prueba PCR y BAAR (≤ 0.05).

Dependencia Prueba PCR	Valor de Chi- cuadrada	Grados de libertad	Probabilidad
CULTIVO	4.932	2	0.085
BIOPSIA	1.947	4	0.745
BAAR	8.938	1	0.003
ADA	2.841	3	0.417

Tabla 9

Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable cultivo. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas.

			Cultivo			Total
			Negativo	Positivo	Negativo por contaminación	
ADA	1	Cantidad	15	0	0	15
		% del Total	19.20%	0%	0%	19.20%
	2	Cantidad	19	0	0	19
		% del Total	24.40%	0%	0%	24.40%
	3	Cantidad	25	0	0	25
		% del Total	32.10%	0%	0%	32.10%
	4	Cantidad	16	2	1	19
		% del Total	20.50%	2.60%	1.30%	24.40%
Total	Cantidad	75	2	1	78	
	% del Total	96.20%	2.60%	1.30%	100%	

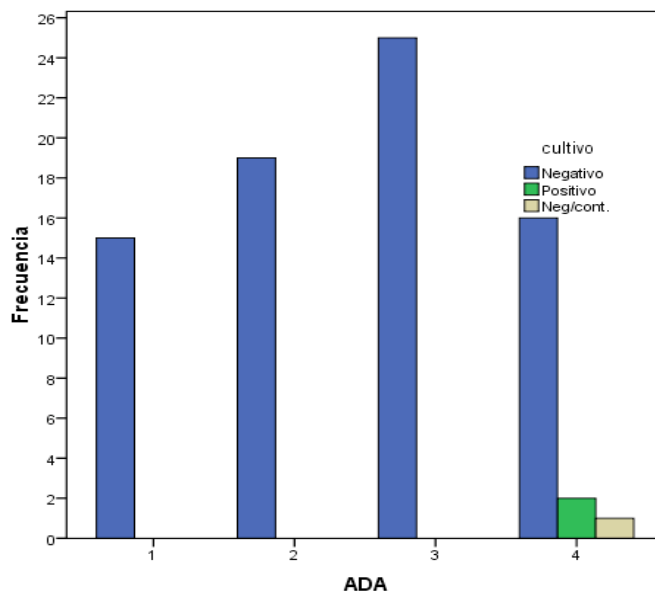


Figura 5: Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable Cultivo. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas (Neg/cont= negativo por contaminación).

Tabla 10

Frecuencia cruzada de los valores de ADA con la variable PCR. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas.

			PCR		Total
			Negativo	Positivo	
ADA	1	Cantidad	10	5	15
		% del total	13.80%	6.40%	19.20%
	2	Cantidad	12	7	19
		% del total	15.40%	9%	24.40%
	3	Cantidad	21	4	25
		% del total	26.90%	5.10%	32.10%
	4	Cantidad	13	6	19
		% del total	16.70%	7.70%	24.40%
Total	Cantidad	56	22	78	
	% del total	71.80%	28.20%	100%	

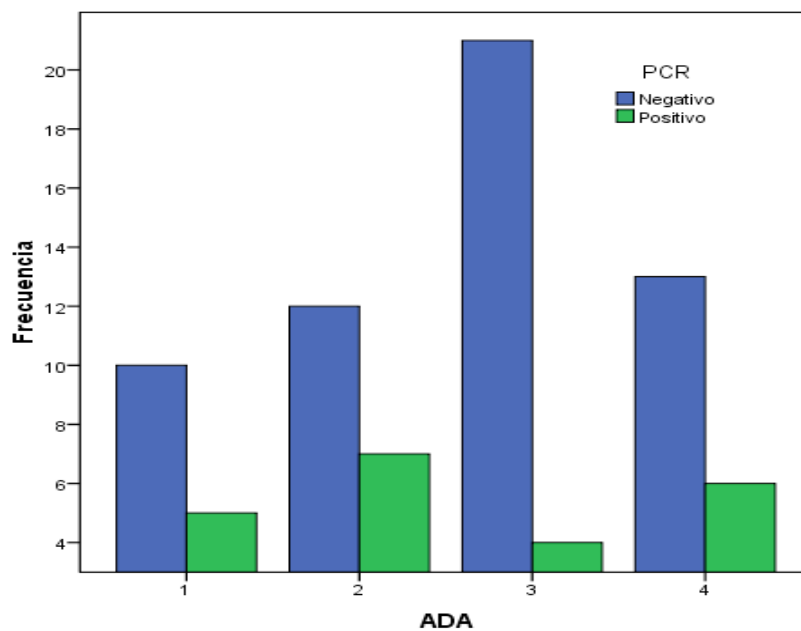


Figura 6: Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable PCR. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas.

Tabla 11

Frecuencia cruzada de los valores de ADA con la variable BAAR. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas.

		BAAR		Total	
		Negativo	Positivo		
ADA	1	Cantidad	15	0	15
		% del total	19.20%	0%	19.20%
	2	Cantidad	19	0	19
		% del total	24.40%	0%	24.40%
	3	Cantidad	24	1	25
		% del total	30.80%	1.30%	32.10%
	4	Cantidad	15	4	19
		% del total	19.20%	5.10%	24.40%
Total		Conteo	73	5	78
		% del total	93.60%	6.40%	100%

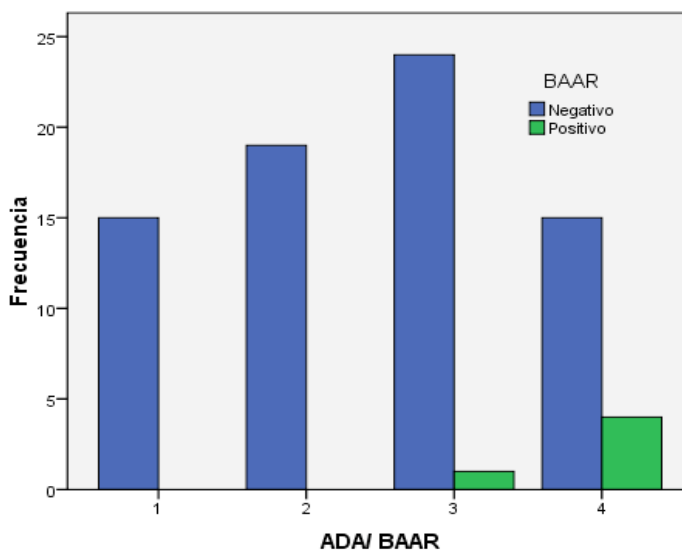


Figura 7: Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable BAAR. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas.

Tabla 12

Frecuencia cruzada de los valores de ADA con la variable biopsia. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas.

		Biopsia					Total
		Malignidad	Alteraciones inflamatorias	Alteración en células mesoteliales	Alteración en células linfoides	Negativo para TB/ Otros	
ADA	1	Cantidad 2	5	2	0	6	15
		% del total 2.60%	6.40%	2.60%	0.00%	7.70%	19.20%
	2	Cantidad 5	8	2	0	4	19
		% del total 6.40%	10.30%	2.60%	0.00%	5.10%	24.40%
	3	Cantidad 3	15	3	1	3	25
		% del total 3.80%	19.20%	3.80%	1.30%	3.80%	32.10%
	4	Cantidad 0	15	1	0	3	19
		% del total 0.00%	19.20%	1.30%	0.00%	3.80%	24.40%
Total		Cantidad 10	43	8	1	16	78
		% del total 12.80%	55.10%	10.30%	1.30%	20.50%	100%

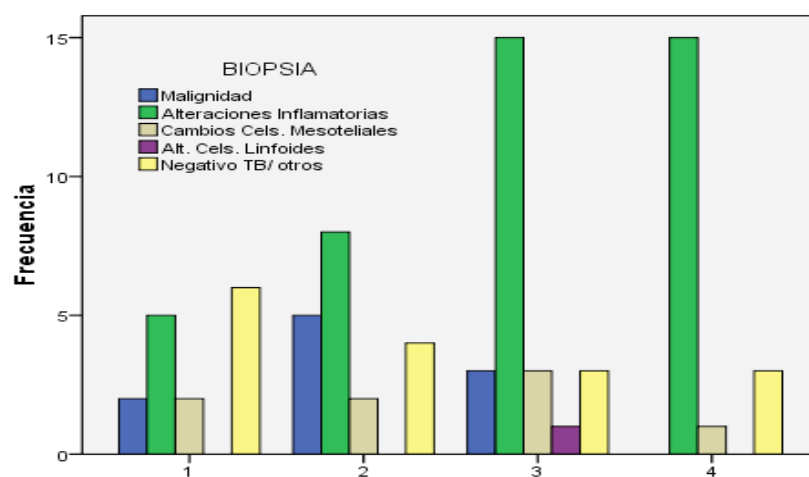


Figura 8: Frecuencia cruzadas de los valores de ADA con la variable Biopsia. Los porcentajes son con respecto a las 78 muestras consideradas.

Tabla 13

Frecuencia cruzada de los valores de PCR con la variable cultivo. Los porcentajes son con respecto al total (95).

			Cultivo			Total
			Negativo	Positivo	Negativo por contaminación	
PCR	Negativo	Cantidad	65	0	2	67
		% del total	68.40%	0%	2.10%	70.50%
	Positivo	Cantidad	25	2	1	28
		% del total	26.30%	2.10%	1.10%	29.50%
Total		Cantidad	90	2	3	95
		% del total	94.70%	2.10%	3.20%	100%

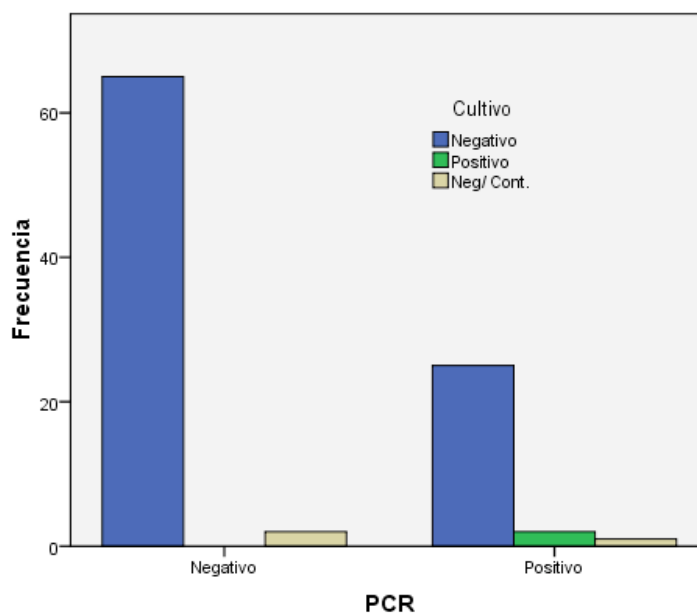


Figura 9: Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable cultivo. Los porcentajes son con respecto al total (95). Neg/Cont= negativo por contaminación.

Tabla 14

Frecuencia cruzada de los valores de PCR con la variable BAAR. Los porcentajes son con respecto al total (95).

			BAAR		
			Negativo	Positivo	Total
PCR	Negativo	Cantidad	66	1	67
		% del total	69.50%	1.10%	70.50%
	Positivo	Cantidad	23	5	28
		% del total	24.20%	5.30%	29.50%
Total	Cantidad	89	6	95	
	% del total	93.70%	6.30%	100%	

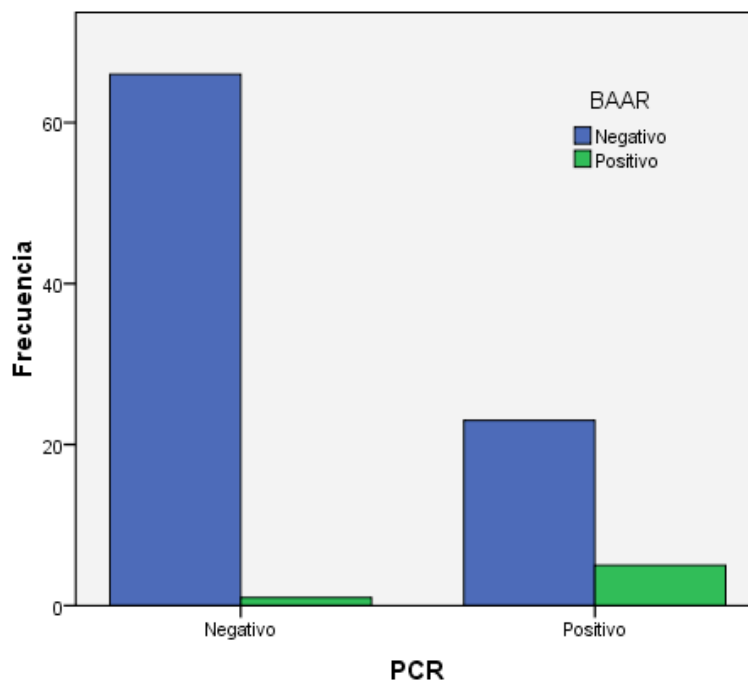


Figura 10: Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable BAAR. Los porcentajes son con respecto al total (95).

Tabla 15

Frecuencia cruzada de los valores de PCR con la variable biopsia. Los porcentajes son con respecto al total (95).

			Biopsia					Total
			Malignidad	Alteraciones inflamatorias	Alteración en células mesoteliales	Alteración en células linfoides	Negativo para TB/ Otros	
PCR	Negativo	Cantidad	9	40	5	1	12	67
		% del total	9.50%	42.10%	5.30%	1.10%	12.60%	70.50%
	Positivo	Cantidad	3	14	4	1	6	28
		% del total	3.20%	14.70%	4.20%	1.10%	6.30%	29.50%
Total		Cantidad	12	54	9	2	18	95
		% del total	12.60%	56.80%	9.50%	2.10%	18.90%	100%

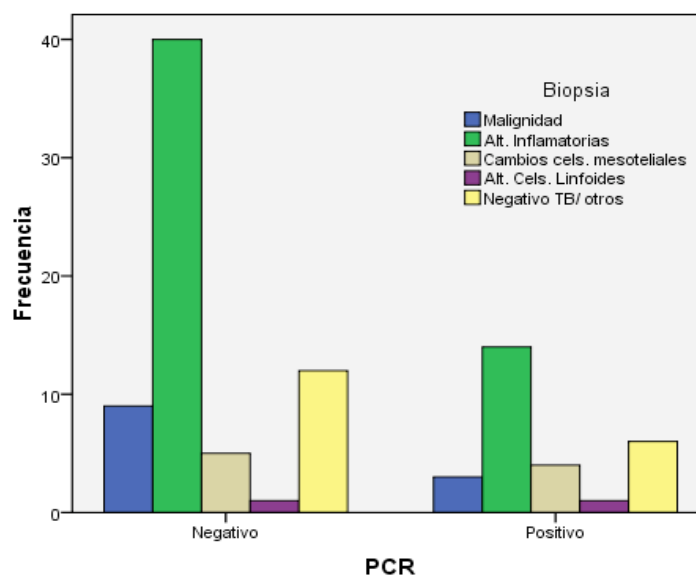


Figura 11: Frecuencia cruzadas de los valores de PCR con la variable biopsia. Los porcentajes son con respecto al total (95). Alt= alteraciones.

7. DISCUSIÓN

Los métodos tradicionales de diagnóstico para la tuberculosis pleural han sido el aislamiento del bacilo en cultivo y/o su reconocimiento por observación a nivel microscópico. Sin embargo, el diagnóstico por tinción carece de sensibilidad y es el cultivo, la técnica considerada como el estándar de oro (Lima *et. al.* 2003).

En el presente estudio el número muestras positivas en cultivo fue de 2 de 95, mientras que el análisis citológico de los líquidos pleurales fue negativo para todas las muestras, confirmando su bajo nivel diagnóstico. Sin embargo, la tinción de BAAR, reportada generalmente con bajo nivel de sensibilidad y especificidad arrojó mas resultados positivos (6 de 95).

El escaso número de resultados positivos en cultivo puede deberse a las dificultades que representa cultivar *M. tuberculosis*, debido a que esta técnica solo es capaz de detectar las micobacterias en muestras que contengan de 50 a 1000 bacilos por ml. (Wolinsky E. 1994). La baja sensibilidad del cultivo de líquido pleural fue descrita desde los años setenta en un estudio realizado por Berger y Mejía donde demostraron que en muestras cultivadas de líquido pleural era posible detectar el bacilo en solo del 20% al 30% de pacientes infectados (Berger, Mejía. 1973). En el presente trabajo, el porcentaje de muestras positivas fue de 2.1%, lo cual es menor a los resultados obtenidos al estudio referido.

Estudios de análisis bacteriológicos de líquido pleural, señalan la ventaja de contar con sistemas radiométricos de cultivo de micobacterias, tal como el sistema BACTEC, que arrojan resultados mas rápidamente (18 días) que el sistema convencional (33 días) (Gopi *et. al.* 2007).

En esta investigación utilizando el sistema BACTEC se obtuvo actividad metabólica solamente en 5 cultivos de las muestras que se analizaron, éstas fueron re-cultivadas y posteriormente se les hizo la tinción de Ziehl-Neelsen nuevamente, y solo

dos demostraron la presencia de *M. tuberculosis*. Cabe mencionar que las 3 muestras detectadas como positivas por el sistema BACTEC y que no confirmaron ser micobacterias, fueron las procesadas por la técnica de siembra directa (sin lavado/descontaminación con NaOH) y sus pares descontaminadas se detectaron como negativas por el sistema biométrico, no así para las 2 muestras que presentaron crecimiento tanto en el cultivo directo como en el lavado/descontaminado de la primera siembra, y en la resiembra tomada del medio BD-MGIT[®] después de ser detectadas como positivas por el sistema automatizado.

Aunque la evaluación de citologías en biopsias pleurales es considerada como una buena herramienta para el diagnóstico de la TBP, en nuestro estudio no se demostró la presencia de *M. tuberculosis* en los líquidos pleurales por esta técnica, sin embargo, los hallazgos histopatológicos característicos (tales como alteraciones inflamatorias y granulomas), sugirieron el diagnóstico, aunque estos signos clínicos también pueden ser causados por otros agentes infecciosos como sarcoidosis, artritis reumatoide e infección por nocardia (Gopi *et al.* 2007).

Por otra parte, la ADA es una enzima que participa en el catabolismo de las purinas. La experiencia internacional ha demostrado que la dosificación de ADA en líquido pleural es una valiosa ayuda para el diagnóstico de la TB.

La determinación estándar de ADA se basa en la medición de su actividad, y no en la cantidad de enzima presente. Una unidad de ADA es la actividad enzimática requerida para producir 1 mol/L de amonio por minuto a partir de la adenosina en condiciones de ensayo.

El valor medio de las lecturas de ADA y nuestro valor de corte fueron de 14 UI y 27 UI respectivamente, bajas en comparación a otros estudios y al no haber estudio nacional que lo sustente ni estudios regionales para consignarlo, el valor de corte que utilizamos para considerar positiva la prueba de ADA fue de 27 UI basándonos en que este es el mínimo valor considerado según Lima y colaboradores en estudios en

Latinoamérica y es cercano al valor de corte mínimo publicado por Quiñones y colaboradores donde analizaron la validez de la prueba de adenosina en diversas regiones del planeta y consideraron 30 UI como el menor valor de corte (Lima *et al.* 2003; Quiñones Silva *et al.* 2010).

Sin embargo, en un estudio en Uruguay, Cointinho y colaboradores afirman que 40 UI es el valor de corte óptimo para el diagnóstico de tuberculosis (Cointinho *et al.* 2007) y en Perú se utiliza el valor de 45 UI basados en estudios realizados en Barcelona, lo cual fue duramente criticado debido a que no se deben extrapolar estos datos, sobre todo cuando la prevalencia es distinta en las poblaciones estudiadas (Quiñones Silva *et al.* 2010).

El valor de corte para tuberculosis sigue estando sujeto a debate, ya que la literatura presenta una gran variación de esos valores en un rango de 27 hasta 95 UI (Lima *et al.* 2003, Rojas *et al.* 1993.), esto dificulta el definir un valor de corte universal y a la vez, este debe ser validado para cada región y cada servicio donde se emplee esta técnica.

Los valores bajos pueden deberse al descenso de la actividad ADA como consecuencia de la colecta, transporte y almacenamiento a temperaturas inadecuadas (Miller *et al.* 2004). Por otro lado, Lee y colaboradores demostraron que la medición de ADA era consistente y reproducible varias semanas, y hasta un año en congelación, lo que tiene un gran valor clínico ya que si no se tiene un diagnóstico definitivo con la pruebas tradicionales, la muestra de fluido pleural, si se almacena correctamente, puede ser empleada para determinar ADA, evitando así, la necesidad de repetir la toracocentesis (Lee *et al.* 2001). En nuestro protocolo se mantuvieron las muestras en congelación y se procuró no exponerlas a cambios de temperatura hasta el momento de realizar el ensayo.

En los líquidos estudiados existieron pacientes con niveles de ADA superiores a 27 UI y que no presentaron resultados positivos en las otras pruebas, esto se ha reportado que ocurre en otras enfermedades como artritis reumatoide, carcinoma bronco-

alveolar, mesotelioma, neumonía por mycoplasma y/o clamidia, mononucleosis infecciosa, brucelosis, fiebre del mediterráneo, histoplasmosis, coccidioidomicosis y en la mayoría de los pacientes con empiema, en las que se reconocen incrementos en la actividad de la enzima y en la toma inadecuada de la muestra, ya que se ha demostrado que la destrucción de leucocitos libera ADA intracelular y la presencia de hemoglobina eleva la lectura del ensayo (Coitinho *et al.* 2007) (Gopi *et al.* 2007).

En los líquidos pleurales analizados, se reportaron 10 biopsias pleurales con diagnóstico de malignidad, a 3 no se les cuantificó ADA por presentar hemoglobina. Las 7 muestras restantes con diagnóstico de malignidad, presentaron valores de ADA inferiores a 13 UI. Nuestros resultados tienen semejanza a los reportados por Yu y colaboradores donde las efusiones pleurales con diagnóstico de malignidad arrojaron valores de ADA menores a 16 IU. Con base en lo anterior, Yu sugiere que la cuantificación de los niveles de ADA puede ser útil para diferenciar derrames pleurales causados por malignidad o de origen tuberculoso (Yu *et al.* 2010). Anteriormente, Lee y colaboradores obtuvieron valores promedio de 15.3 UI en 27 líquidos pleurales con diagnóstico de malignidad (Lee. *et al.* 2001).

Nuestros resultados muestran que la ADA arrojó mayor número de resultados positivos (9 de 95) que la bacteriología y la histología. La cuantificación de ADA demostró dependencia estadística ($p= 0.025$) con la tinción de BAAR más no con la técnica de PCR ($p=0.417$).

El ensayo de cuantificación de ADA resultó ser una técnica rápida y barata, lo que es una ventaja en zonas endémicas de bajos recursos y por tratarse de una técnica sencilla, es posible acortar los tiempos diagnósticos en forma sustancial. Esta ventaja adicional al bajo costo de la ejecución ayuda a evitar biopsias sobre todo en niños y en pacientes inmunosuprimidos. No obstante hay diferencias entre autores, que aunque no dudan de la utilidad, algunos indican que el rendimiento diagnóstico del ADA parece ser lo suficientemente alto para evitar biopsias en los pacientes reacios a sufrir procedimientos invasivos. Posteriormente, nuevas investigaciones señalaban ser

cautelosos ante los resultados de la prueba por la presencia de muchos falsos positivos, y recomendaban completar el estudio con pruebas invasivas como una biopsia pleural (Quiñones-Silva *et al.* 2010)

En cuanto a la prueba de PCR, el protocolo empleado en este estudio se basó en la amplificación de una porción del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* localizado en la secuencia de inserción *IS6110* que se repite aproximadamente 20 veces en el genoma de la micobacteria y es específica para el complejo de *M. tuberculosis*.

Debido a que la tuberculosis pleural es una enfermedad paucibacilar, la prueba de PCR es recomendada ya que puede detectar cantidades mínimas como 10 micobacterias por muestra.

La sensibilidad de la amplificación de los ácidos nucleicos depende del número de micobacterias, la distribución homogénea en la muestra, la presencia de inhibidores de la amplificación, el tipo de primer utilizado y la secuencia genómica amplificada (Gopi *et al.* 2007).

Gopi y colaboradores analizaron los resultados de estudios de diagnóstico y tratamiento de efusiones pleurales tuberculosas realizados a nivel mundial durante el año 2006, y observaron que la prueba de PCR era positiva en el 100% de los casos de cultivos positivos pero, un 30 a 60% de los análisis de PCR eran positivos en muestras cultivo-negativas (Gopi *et al.* 2007). En nuestro caso, la prueba fue positiva en el 100% de los cultivos positivos y en el 26% de los líquidos pleurales cultivo-negativos.

En nuestros ensayos la prueba de PCR arrojó el mayor número de resultados positivos (26), 19 de los cuales no demostraron serlo en alguna de las otras pruebas. Estudios independientes reportados por Lima y Clarridge, presentan casos de pacientes que dan resultados PCR positivos para TB, y negativos en el resto de las pruebas. Según los autores, estos pacientes tuvieron historial previo de TB 20 años antes (Lima *et al.* 2003; Clarridge *et al.* 1993). Por lo anterior, no se excluye la posibilidad de reactivación

de la enfermedad debida posiblemente a la inmunodeficiencia asociada a otros padecimientos clínicos. Otra explicación es la detección por la PCR de *M. tuberculosis* no viables, presentes en la muestras (Gopi *et al.* 2007).

También debe ser considerada la posibilidad de contaminación cruzada, aunada a la sensibilidad de la prueba, sin embargo, en nuestro procesos siempre nos apegamos a las condiciones de ensayo empleadas para prevenir contaminación, además, las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados fueron reproducibles.

Aunque numerosas publicaciones avalan a la prueba de PCR como un estudio de alta sensibilidad y especificidad, las desventajas de la prueba de PCR incluyen alto costo, riesgo de contaminación y que la tecnología requerida para su procedimiento no permite diagnósticos de rutina para todo el medio hospitalario.

El no obtener suficientes resultados positivos en cultivo y biopsias fue una limitante para calcular sensibilidad y especificidad estadística, ya que estas pruebas son consideradas el estándar dorado para realizar los cálculos. Sin embargo, pudimos determinar dependencia estadística mediante el cálculo de Chi-cuadrada entre las pruebas tradicionales y las técnicas de PCR y ADA (tablas 7 y 8).

Para probar relaciones entre los resultados obtenidos o la independencia de las variables se utilizaron tablas cruzadas. Se compilaron los resultados de cada estudio y se determinó la distribución Chi-cuadrada para probar en última instancia si los resultados de las técnicas a probar eran independientes a los resultados de los métodos tradicionales.

Tanto el ensayo de PCR como la cuantificación de ADA mostraron ausencia de diferencia estadísticamente significativa con la prueba de BAAR [(p=0.003) y (p=0.025) respectivamente]. Esto significa que existe una alta probabilidad de obtener resultados positivos de ADA y PCR en derrames pleurales diagnosticados como BAAR positivos, sin embargo, la tinción de BAAR aunque es bien aceptada para muestras

pulmonares no lo es para derrames pleurales, por el bajo número de bacilos presentes en este último (Lima *et al.* 2003),(Gopi *et al.* 2007).

Por la experiencia obtenida en el presente estudio, podemos concluir que tanto las pruebas de PCR y ADA son técnicas que pueden ser una valiosa ayuda diagnóstica, mejores que la bacteriología y la histología, aunque no para sustituir estos métodos tradicionales y bien establecidos, pero si como herramientas adicionales para el diagnóstico de Tb pleural, en otras palabras, ambas técnicas sirven mas como pruebas para diagnosticar tuberculosis pleural, una vez que se tenga la sospecha clínica o radiológica, que para descartar su presencia. De esta forma, un resultados positivo sería mejor aprovechado por el clínico, mas que un resultado negativo.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1. Conclusiones

- La determinación de ADA en líquidos pleurales puede ser de utilidad para el diagnóstico etiológico de los derrames pleurales no piogénicos.
- Posiblemente, la prueba de ADA da valores menores a 13 UI en derrames pleurales con diagnóstico de malignidad.
- Las pruebas de PCR y ADA tienen dependencia significativa con la tinción de BAAR, esto significa, que existe una alta probabilidad de obtener resultados positivos de ADA y PCR en derrames pleurales diagnosticados como BAAR positivos.
- La prueba de PCR presenta el mayor número de casos positivos (26 de 95), puede deberse a contaminación, reactivación de la infección y/o detección de microorganismos no viables.
- El cultivo de líquido pleural y sus estudio histopatológico arrojan pocos o nulos resultados positivos (2 de 95 y 0 de 95 respectivamente).
- Las pruebas de PCR y ADA pueden complementar, pero no sustituir los estudios tradicionales para diagnóstico de tuberculosis pleural.

8.2. Recomendaciones

- Estudiar otras enfermedades que elevan los niveles de ADA, así como las condiciones de envío y almacenamiento que pudieran afectar su cuantificación.
- Cuantificación de los niveles de ADA en un mayor número de pacientes con diagnóstico de malignidad vs diagnóstico de tuberculosis. En pacientes de nuestra región.
- Corroborar el historial previo (10 a 20 años) de TB en pacientes PCR positivos.
- Realizar ensayos de PCR y ADA en pacientes cultivo positivo de líquido pleural, para determinar verdaderos positivos y calcular sensibilidad y especificidad.

9. LITERATURA CITADA

- Arciniegas QW, Orjuega Z. 2005. Tuberculosis Pleural. Salud IUS; 37: 127-132.
- Asociación Médica Mundial. 2008. Declaración de Helsinki, Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 59ª Asamblea General, Seúl, Corea. [On Line] Disponible en : <http://www.wma.net/>
- Berger HW, Mejía E. 1973. Tuberculosis pleurisy. Chest 63: 88-92.
- Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Deneef JF, Cocito C, Gala JL. 2000. Duplex PCR for Differential Identification of Mycobacterium bovis, M. avium, M. avium subsp. paratuberculosis in formalin-fixed paraffin embedded tissue from cattle” Journal of Clinical Microbiology. 38 (8): 3048-3054.
- Clarridge J, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaiyts BB. 1993. Large-Scale Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of Mycobacterium tuberculosis in a Routine Mycobacteriology Laboratory. Journal of Clinical Microbiology. 93 p. 2049-2056
- De Wit D, Maartens G, Steyn L. 1992. A Comparative Study of the Polymerase Chain Reaction and Conventional Procedures for Tuberculosis Pleural Effusion. Tuberculosis Lung Disease 73:262-267.
- Diario Oficial, Secretaria de Salud. Septiembre de 2005. Modificación la Norma Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la Prevención y control de la Tuberculosis en la Atención Primaria en la Salud. Primera sección, pp. 2.
- Epstein DM, Kline LR, Albelda SM and Miller WT. 1987. Tuberculosis pleural efusions. Chest ; 91: 106-109.
- Giusti G. 1974. Adenosine deaminase. En: Bergmeyer HU, (eds). Methods of enzymatic analysis. 2nd edition. New York: Academic Press. p. 1092-99.
- González Saldaña Napoleón 2007. Estado Actual de la Tuberculosis en México y el Ambiente Mundial. VI Congreso Nacional de Vacunación. Vacunación Hoy vol. 15 num. 86;50-55. México. Noviembre-Diciembre.
- Gopi Arun, Madhavan Sethu, Sharma Surendra, Sahn Steven. 2007. Diagnostic and Treatment of Tuberculous Pleural Effusion in 2006. Chest; 131 (3) 880-887.
- Haa DW. 2000. Mycobacterial Disease. Mandell principals and practice of infection disease. Fifth edition. Churchill Livingston of harcourt health science Co.

- Hospital General de México. 2004. Guías Diagnosticas de Neumología. Clasificación CIE10, [Online]. Disponible en: http://www.hospitalgeneral.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/neumo/6de_rrame_pleural.pdf
- Khatami K, 2000 Pleural Tuberculosis, Department of Internal Medicine, SUMS. Shiraz E-Medical Journal. [Online]. Disponible en: <http://pearl.sums.ac.ir/semj/vol3/jul2002/PleuralTB.htm>
- Lee Gary, Rogers Jeffrey T, Rodriguez Michael. 2001. Adenosine Deaminase Levels in Nontuberculous Lymphocytic Pleural Effusions. Chest: 120: 356-362.
- Lima DM. Colares JK. Da Fonseca BA. 2003. Combined Use of the Polymerase Chain Reaction and Detection of Adenosine Deaminase Activity on Pleural Fluid Improves the Rate of Diagnosis of Pleural Tuberculosis. Chest;124:909-914.
- Miller Kd, Barnette R, Light R. Stability of adenosine deaminase during transportation. Chest 2004; 126: 1933-7
- Nagesh, Babu S. 2001. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in Pleural Fluid. Chest;119: 1737-1741
- OMS, 2009. Control Mundial de la TB- informe 2009.
- Panlo P, Tiberio G. 2007. Tuberculosis Extrapulmonar. Anales del Sistema Sanitario de Navarra; 30 (2): 143-162.
- Quiñones-Silva JB, Ramírez-Yépez CH, Peña-Oscuvilca A, Estrada-Choque E. 2010. Validez de la prueba de adenosina deaminasa y del recuento diferencial de leucocitos para el diagnóstico de tuberculosis pleural. An Fac med; 71(1): 18-22
- Raviglione MC, Luelmo F. 1996. Update on the global epidemiology of tuberculosis. Current Issues in Public Health 2(4):192-7.
- Rodríguez IP, Barrera HA. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7(3): 323-335.
- Rodríguez A, Palma J, Maestre L, Saavedra D, Reyes T, Perovani M. 2000. Detección de Micobacterias en Muestras Clínicas Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Revista Biomédica. 11 (4): 257-262

- Rojas B, Yi A, Accinelli R. 1993. Adenosina Deaminasa (ADA) en el Diagnóstico de Tuberculosis Pleural. *Revista Médica Herediana* 4 (3) : 115-118.
- Secretaría de Salud, 2007. Guía Práctica para la atención de la Tuberculosis en Niños, Niñas y Adolescentes, Programa Nacional de Tuberculosis. ISBN 970-721-334
- Valdés L, Álvarez D, San José E, Penela P, Valle JM, García-Pazos JM, Suárez J, Pose A. 1998. Tuberculosis Pleurisy. *Archives of Internal Medicine* 158: 2017-2021.
- Vera-Cabrera L, Hernandez-Vera MA, Welsh O, Jonson WM, Castro-Garza J. 2001. Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (10): 3499-3504
- Villegas MV, Labrada LA. 2000. Evaluation of Polymerase Chain Reaction Adenosine Deaminase and Interferon δ in Pleural Fluid for the Differential Diagnostic of PTB. *Chest* 118: 1355-1364.
- Villena GV, Ferrer SJ, Hernández BL, de Pablo GA, Perez RE, Rodriguez PF ; *et al.* 2006. Diagnóstico y Tratamiento del Derrame pleural. *Archivos de Bronconeumología* 142 (7):349-372.
- Wolinsky E. Conventional diagnostic methods for tuberculosis. 1994. *Clinical Infectology Disease* 19: 396-401
- Yu YX, Tong ZH, Gong JN, Wang Z, Wang XJ, Xu LL, Wu YB, Li HJ, Wang C. 2010. Evaluation of the diagnostic value of adenosine deaminase activity in tuberculous pleuritis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 33(4):273-5.
- Zenteno CR. 2003. Pasado, presente y futuro de las técnicas de diagnóstico de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*. 16 (3): 181-186
- Zuñiga-Ramirez C, Soto-Hernández JL. 2005. Determinación de Adenosin Deaminasa (ADA) en líquido Cefalorraquídeo (LCR) Como auxiliar diagnóstico en meningitis por tuberculosis. *Archivos de Neurociencia (México)* 10 (1): 2-8

RESUMEN BIOGRÁFICO

Judith Fuentes León

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE PCR Y ADA EN
DERRAME PLEURAL DE PACIENTES PRESUNTIVOS DE TUBERCULOSIS

Campo de Estudio: Microbiología Médica

Datos Personales: Nacida en Orizaba, Veracruz el 9 de Febrero de 1973, hija de Ricardo Fuentes Pensamiento y Elena León Clement.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo, año 1997.

Experiencia Profesional: Química clínica en el departamento de Laboratorio y Anatomía Patológica.