

La reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) como método diagnóstico rápido de tuberculosis paucibacilar*

Sandra Vélez
Gloria Sanclemente
Amparo Ochoa
Luis Alfonso Correa

RESUMEN

Se describe el caso de un niño de 5 años de edad, quien presentó un cuadro de meningoencefalitis de causa desconocida, además de una placa verrucosa en la piel de su pie izquierdo. Los exámenes en busca de los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en jugo gástrico, líquido cefalorraquídeo (LCR) y biopsia de piel fueron negativos. El DNA fue extraído de la biopsia de piel y luego amplificado por PCR, usando sondas específicas para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y su especificidad fue confirmada por dot blot. Dos semanas después de haber iniciado la terapia antituberculosa, el cultivo de piel y LCR reafirman el diagnóstico inicial.

Palabras clave: tuberculosis cutánea, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR.

HISTORIA CLÍNICA

Niño de 5 años de edad, indígena de la comunidad embera, quien consultó por cuadro de cefalea, vómito y fiebre subjetiva de 8 días de evolución, con deterioro progresivo del estado de conciencia. Desde hace 8 meses presentaba placa verrucosa exofítica, no dolorosa, localizada en dorso del pie izquierdo de 5x4 cm (Figura 1), además de dos lesiones cicatriciales en región inguinal y poplíteo del mismo lado, sin antecedente de trauma previo o historia personal ni familiar clara de tuberculosis.

Sus exámenes de laboratorio mostraron: hemograma: Hb 11.2g/dl, Hto 36%, leucocitos 18.100/ μ l (neutrófilos: 62%, linfocitos: 10%, monocitos: 26%) plaquetas: 902.000/ μ l,



Figura 1. Placa verrucosa, exofítica e infiltrada localizada en dorso del pie izquierdo.

Sandra Vélez, Residente III Dermatología, Universidad de Antioquia, Medellín.

Gloria Sanclemente, Profesor Dermatología, Universidad de Antioquia, Medellín.

Amparo Ochoa, Profesor Dermatología, Universidad de Antioquia, Medellín.

Luis Alfonso Correa, Profesor Dermatopatología, Universidad de Antioquia, Medellín.

Correspondencia: Sandra Vélez O, Hospital Universitario San Vicente de Paúl, calle 64 x carrera 51D-10. teléfono 2637667, Medellín, Colombia.

*Presentado en la "Reunión de los Jueves" de la Sociedad Antioqueña de Dermatología (SADE)

La reacción en cadena de polimerasa (PCR)

VSG: 50 mm/h. RX de tórax: normal. En jugo gástrico no se observaron BAAR.

Líquido cefalorraquídeo: proteínas totales 124 mg/dl, glucosa 17 mg/dl, neutrófilos 30 mm³, linfocitos 45 mm³, ph alcalino, no se observaron BAAR.

HIV negativo, TAC de cráneo mostró hidrocefalia comunicante.

Biopsia de piel: se observó una hiperplasia pseudoepiteliomatosa y una capa córnea hiperortoqueratósica con focos compactos de paraqueratosis. En la dermis superficial y media presentaba un denso infiltrado inflamatorio crónico constituido por linfocitos, plasmocitos, histiocitos, células gigantes multinucleadas y eosinófilos dispersos con formación de granulomas. No se observó necrosis de caseificación. La coloración de Ziehl Neelsen para BAAR inicialmente fue negativa.

Como los exámenes iniciales fueron todos negativos en la búsqueda de los BAAR en jugo gástrico, LCR y piel, se decide hacer PCR del tejido de la biopsia de piel, la cual es positiva para *M. tuberculosis* (Figura 2). Asimismo se realizó dot blot para confirmar los resultados obtenidos por PCR. Se realizaron nuevos cortes de la biopsia de piel y en esta oportunidad la tinción de ZN reveló dos bacilos (Figura 3). Con estos hallazgos se hizo diagnóstico de tuberculosis verrucosa cutis, meningoencefalitis tuberculosa e hidrocefalia comunicante, y se inició tratamiento para tuberculosis con isoniazida 150 mg/día, rifampicina 150 mg/día, pirazinamida 400 mg/día y prednisona 15 mg/día. Dos semanas después de iniciado el tratamiento se obtienen resultados del cultivo de piel y LCR, los cuales reafirman el diagnóstico de tuberculosis. La evolución del paciente ha sido satisfactoria,

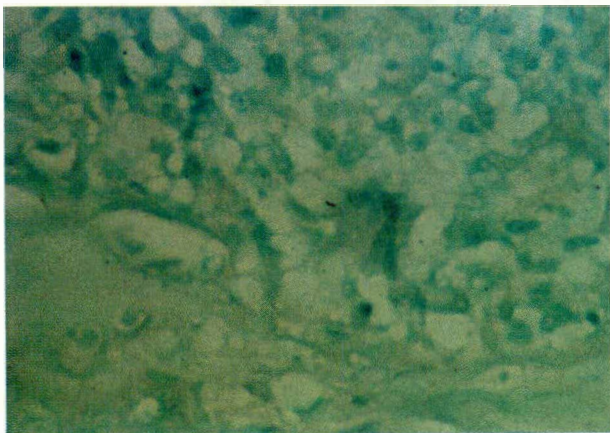


Figura 2. Coloración de ZN positiva para BAAR.

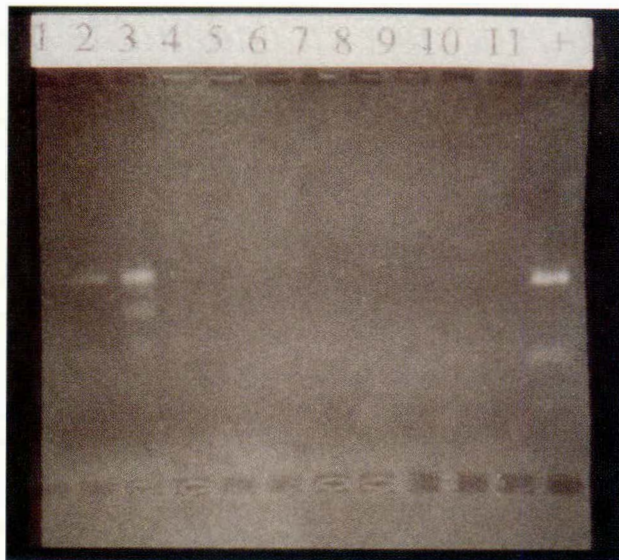


Figura 3. Fotografía del gel de agarosa al 2%, donde se observa en la columna 3 la banda correspondiente a los productos de PCR obtenidos de la muestra de piel del paciente, frente a un control positivo para *M. tuberculosis* en la columna (+).

con resolución completa de sus lesiones en piel y ausencia de hallazgos neurológicos.

DISCUSIÓN

La tuberculosis es una infección crónica que afecta típicamente los pulmones, pero puede afectar otros sistemas, por ejemplo tracto genitourinario, hueso, sistema nervioso central y menos frecuentemente piel y tejido celular subcutáneo. El agente causal es el *Mycobacterium tuberculosis*, que infecta una tercera parte de la población mundial. En 1997 se detectaron 7.96 millones de casos nuevos de tuberculosis en el mundo, con 1.87 millones de muertes y 16.2 millones de casos existentes de la enfermedad. La tuberculosis es la primera causa de muerte mundial debida a un solo agente infeccioso. Su incidencia es mayor en minorías étnicas y raciales como los hispanos, afroamericanos e indígenas; igualmente el 80% de los casos en los niños fueron diagnosticados en estas poblaciones.¹

La tuberculosis cutánea es una enfermedad rara, con una distribución mundial cuya incidencia es bastante baja (0.1-1%) si la comparamos con los demás trastornos

La reacción en cadena de polimerasa (PCR)

cutáneos. El agente causal es principalmente el *M. Tuberculosis*, y más raramente puede ser producida por el *M. bovis* e incluso por la vacuna BCG.

Las manifestaciones clínicas comprenden numerosas formas cutáneas y, por lo tanto, han existido diferentes clasificaciones; quizás la más práctica es la siguiente:

- I. Tuberculosis cutánea de fuente exógena
 - A. Tuberculosis verrucosa cutis
 - B. Chancro de inoculación primaria
- II. Tuberculosis cutánea de fuente endógena
 - A. Diseminación por contigüidad: escrofuloderma
 - B. Autoinoculación: tuberculosis cutis orificialis
- III. Tuberculosis cutánea por diseminación hematológica
 - A. Lupus vulgar
 - B. Diseminación hematológica aguda: tuberculosis cutánea miliar aguda
 - C. Nódulos o abscesos: abscesos tuberculosos metastásicos, guma tuberculoso.²

La tuberculosis cutánea de fuente exógena ocurre después de la inoculación directa del bacilo tuberculoso, generalmente a través de un trauma en la piel o el tejido celular subcutáneo. Dependiendo de si el individuo ha tenido una exposición previa al bacilo o no, se producen una serie de eventos inmunológicos en respuesta a él.

La tuberculosis verrucosa cutis es una forma poco frecuente de tuberculosis cutánea. Se produce por reinfección en un paciente que ya ha sido previamente sensibilizado y ocurre frecuentemente en patólogos, disectores, carniceros o en niños por contacto directo con esputo infectado. La hipersensibilidad del paciente lleva a una florida respuesta epidérmica que frecuentemente produce la lesión verrucosa o hiperqueratósica solitaria y asintomática, 2-4 semanas después de la inoculación. En poco tiempo se desarrollan otras pápulas y aparece una placa firme, indurada, con un borde inflamatorio que muestra extensión periférica gradual. En la superficie verrucosa pueden observarse fisuras, de las cuales puede exprimirse material purulento; las lesiones raramente se ulceran y la linfadenopatía regional está ausente. Estas lesiones se localizan en superficies expuestas como las manos, los antebrazos o la cara, pero en los niños el sitio de predilección son los miembros inferiores. Las lesiones pueden ser autolimitadas y resolverse con cicatrización aún sin tratamiento, pero esto puede tomar meses o años.^{2,3}

En los individuos infectados por micobacterias la inmunidad celular es la respuesta inmune primaria; por ejemplo, en el lupus vulgar hay una fuerte respuesta de inmunidad celular y cultivos negativos con un aumento de la relación CD4/CD8. En contraste, la escrofuloderma presenta una débil respuesta de inmunidad celular, con cultivos positivos y necrosis de caseificación. En la tuberculosis verrucosa cutis se presenta una respuesta inmunológica intermedia entre éstas dos últimas.²

El diagnóstico de la tuberculosis cutánea es bastante complejo, puesto que no siempre es característica la apariencia de las lesiones. La biopsia de piel no es patognomónica con hallazgos como la hiperplasia pseudoepiteliomatosa, infiltrado inflamatorio con formación de abscesos, y presencia de células epitelioides y gigantes. Siempre se le deben realizar coloraciones de ZN en busca de los bacilos pero, al igual que el cultivo, los resultados no siempre son positivos. El cultivo tradicional puede tardar entre 4-6 semanas; sin embargo, existen otros métodos de aislamiento como el sistema radiométrico BACTEC, el tubo indicador de crecimiento micobacterial (MGIT) y el cultivo por el método de microcolonia en capa delgada, que tienen una duración más corta (aproximadamente 2 semanas); sin embargo, esta tecnología, además de requerir un tiempo significativo para obtener resultados, es costosa y dispendiosa.⁴

Existen otros métodos diagnósticos por medio de la amplificación del DNA de la micobacteria por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten una rápida detección de la misma en el tejido y ha representado un avance promisorio en el campo de la micobacteriología. En los laboratorios de investigación se ha probado la amplificación de diferentes segmentos del genoma y se ha encontrado que la secuencia de inserción IS6110 tiene una sensibilidad que varía, según los estudios, entre 70-90% y una especificidad entre 90-95%. Un procedimiento adicional de dot blot aumenta la sensibilidad y especificidad de la PCR.⁵ Los diferentes estudios concluyen que la amplificación por PCR del fragmento de inserción IS6110 es un método rápido para la detección de la *M. tuberculosis*, en las biopsias de piel de pacientes con tuberculosis cutánea, especialmente en lesiones paucibacilares, ayudando a confirmar o excluir rápidamente el diagnóstico de tuberculosis, y a tomar decisiones terapéuticas en casos difíciles como éste.

La presentación simultánea de formas de tuberculosis por diseminación hematológica y lesiones cutáneas de fuente exógena son extremadamente raras y, hasta donde

La reacción en cadena de polimerasa (PCR)

tenemos conocimiento, sólo existe un reporte de guma tuberculoso asociado con tuberculosis verrucosis cutis y liquen scrofulosorum.⁶ Otras formas hematógenas encontradas en la literatura son del tipo miliar, las cuales en pacientes inmunosuprimidos se manifiestan como focos de tuberculosis miliar cutánea.^{7,8} Adicionalmente, con respecto al diagnóstico de formas extracutáneas paucibacilares tales como la meningoencefalitis, donde sólo hasta un 13% de pacientes presentan BAAR (+) en LCR, con aislamiento por cultivo de sólo el 30%⁹, se hacen necesarias técnicas más sensibles, específicas y rápidas como la PCR, para el tratamiento oportuno de las formas neurológicas que pudieran dejar secuelas irreversibles. En nuestro paciente fue posible realizar tal técnica en la muestra de piel, lo cual facilita el diagnóstico por utilizarse un tejido más accesible.

En cuanto a los diagnósticos diferenciales de la tuberculosis verrucosa cutis, se incluyen otras formas de tuberculosis cutánea, infecciones por micobacterias no tuberculosas, actinomicosis, esporotricosis, leishmaniasis, cromomicosis, queratoacantoma y carcinoma espinocelular.

Con respecto al tratamiento, los focos extrapulmonares usualmente responden más rápidamente que la tuberculosis pulmonar. Durante los primeros dos meses de tratamiento el régimen debe incluir isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol o estreptomycin; los siguientes 4 meses se continúa con los dos primeros

medicamentos. La resección quirúrgica de las lesiones localizadas es frecuentemente útil como terapia adyuvante.²

En conclusión, presentamos el caso de un niño con un cuadro neurológico y de piel, en el cual el diagnóstico inicial fue difícil por la presentación simultánea de dos manifestaciones inmunológica y epidemiológicamente diferentes de tuberculosis y la negatividad de los exámenes, pero ante la gran sospecha clínica se decide hacer PCR en piel en búsqueda del *M. tuberculosis*, cuya positividad nos permitió hacer un diagnóstico rápido e iniciar la terapia en forma temprana.

SUMMARY

We report a case of a 5-year-old child who presented with meningoencephalitis of unknown cause in addition to a cutaneous verrucous plaque on his left foot. AFB screening in gastric juice, cerebro-spinal fluid, and skin biopsy were all negative. DNA was extracted from skin tissue, and then amplified by PCR using primers specific for the *Mycobacterium tuberculosis* complex, and specificity for the *Mycobacterium tuberculosis* was confirmed by dot blotting. Two weeks after initiating anti-tuberculous therapy results of skin and CSF-TB culture re-confirmed former diagnosis.

Key words: cutaneous tuberculosis, *M. tuberculosis*, PCR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haas D. *Mycobacterium tuberculosis*. En: Mandell. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5a. ed., New York: Churchill Livingstone 2000:2576-2604.
2. Tomecki K, Hall G, Aberg J. Tuberculosis of the skin. En: Demis Clinical Dermatology. Philadelphia 1998: 16-26.
3. Liang M, Rooney J, Rhodes H, et al. Cutaneous inoculation tuberculosis in a child. J Am Acad Dermatol 1999; 41: 860-862.
4. Lucas S. Bacterial disease. En: Lever's Histopathology of the Skin. 8a. ed., Lippincott-Raven Philadelphia:1997; 457-502.
5. Margall N, Baselga E, Coll E et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA by the polymerase chain reaction for rapid diagnosis of cutaneous tuberculosis. Br J Dermatol 1996; 135:231-236.
6. Kakakhel K. Simultaneous occurrence of tuberculous guma, tuberculosis verrucosis cutis and lichen scrofulosorum. Int J Dermatol 1998; 37:867-869.
7. Daikos GL, Uttamchandani RB, Tuda D, et al. Disseminated miliary tuberculosis of the skin in patients with AIDS: report of four cases. J Infect Dis 1998; 27:205-208.
8. Del Giudice P, Bernard E, Perrin C, et al. Unusual cutaneous manifestations of miliary tuberculosis. J Infect Dis 2000; 30:201-204.
9. Yaramis A, Gurkan F, Elevli M, et al. Central nervous system tuberculosis in children: a review of 214 cases. Pediatrics 1998; 102.