



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN

Memoria de Tesis

IDENTIFICACIÓN DE BACILOS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES  
MEDIANTE LA DOBLE TÉCNICA EST EN PACIENTES CON  
TUBERCULOSIS

Que presenta:  
Eladio Salas Torrez

Para obtener el título de:  
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

Tutor de Tesis  
Dr. Braulio Martínez Benítez  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"  
Departamento de Anatomía Patológica

Ciudad de México Junio de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*La persona verdaderamente efectiva tiene la humildad y el respeto necesarios para reconocer sus propias limitaciones perceptuales y apreciar los ricos recursos que pone a su disposición la interacción con los corazones y las mentes de otros seres humanos. Esta persona valora las diferencias porque esas diferencias incrementan su conocimiento y su comprensión de la realidad.*

*Stephen Covey*

---

## AGRADECIMIENTOS

Gracias Eladio y Emma por apoyarme siempre y tener su cariño incondicional en todo momento; Gracias Doricela y Boni por permitirme alejarme de la comodidad y la rutina y por educarme bajo los principios del trabajo duro.

Infinitamente agradecido con Ricardo Aguilar Guadarrama, pues reconocer el trabajo del otro, es admirar las cualidades que uno aspira alcanzar.

Una mujer sabia dijo que es cierto que no sabemos lo que tenemos hasta que lo perdemos, pero también es cierto que no sabemos lo que nos hemos estado perdiendo hasta que lo encontramos, gracias por permitirme encontrar mi pasión profesional.

---

## RESUMEN

### IDENTIFICACIÓN DE BACILOS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES MEDIANTE LA DOBLE TÉCNICA EST EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS

**ANTECEDENTES:** para el diagnóstico de micobacterias existen múltiples métodos, el más utilizado de ellos es la tinción de Ziehl-Neelsen, no obstante, los inconvenientes que presenta son muy variados (tanto técnicos como de interpretación) lo que la hace poco costeable para la detección en tejidos donde no se tiene otro material para valoración a diferencia del pulmón por ejemplo donde el estudio de expectoración es más accesible. Por otra parte, los estudios con fundamento inmunológico y de biología molecular realizados en tejido son poco costeables debidos al gran costo y a la necesidad de infraestructura sofisticada y personal altamente capacitado. Recientemente se ideó un método en el cual se pueden combinar las tinciones de ZN e inmunohistoquímica en un mismo corte, sin embargo existen pocos estudios donde se corrobore su utilidad.

**OBJETIVO:** Comparar la tinción de Ziehl-Neelsen y la prueba de inmunohistoquímica contra *M. tuberculosis* para incrementar la detección de bacilos en pacientes con tuberculosis.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** se revisarán las biopsias de los pacientes que cuenten con el diagnóstico de tuberculosis evaluando la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes con la tinción ZN, la existencia o no de complejos proteicos de la pared celular mediante inmunohistoquímica y la doble tinción ZN/MTB comparando sensibilidad y especificidad de cada uno de ellos.

**RESULTADOS:** De los 32 casos, sólo se identificaron bacilos ácido-alcohol resistentes en el 78.13% (25) con el método tradicional (ZN), a diferencia del método de inmunohistoquímica donde sólo se logró identificar inmunorreactividad en el 62.5%. Con la tinción EST se incrementa notablemente el número de casos positivos en comparación con las dos técnicas aisladas llegando a ser el 90.6%.

**CONCLUSIONES:** La prueba ZN/IHQ es mucho más sensible en comparación con ZN e IHQ por separado. El método de inmunohistoquímica es menos sensible en comparación con ZN, pero la prueba combinada supera al ZN e IHQ por separado.

**Palabras clave:** Tuberculosis, Ziehl-Neelsen, Inmunohistoquímica

---

## ÍNDICE

### Contenido

	Página
Marco teórico.....	1
Metodología.....	20
Resultados.....	25
Discusión.....	29
Conclusiones.....	31
Bibliografía.....	32

---

## MARCO TEÓRICO

### EPIDEMIOLOGÍA

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis (MTB)* que típicamente afecta los pulmones pero puede afectar prácticamente cualquier órgano. Esta enfermedad se considera un problema sanitario a nivel mundial debido a afecta a millones de personas cada año y junto con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ocupa la mayor parte de las causas de muerte a nivel mundial.<sup>1</sup>

La Organización Mundial de la salud estimó que en 2014 hubo 9.6 millones de casos nuevos en todo el mundo, de los cuales 5.4 millones fueron hombres, 3.2 millones mujeres y 1.0 millones niños. En ese mismo año, se registraron 1.5 millones de muertes debidas a tuberculosis (1.1 millones en pacientes VIH negativos y 0.4 millones en pacientes VIH positivos) de las cuales 890000 fueron hombres, 480000 fueron mujeres y 140000 niños. La mayoría de los casos en 2014 se reportaron en Asia (58%) y en África (28%), el resto de los casos se reportaron en la región del Mediterráneo (8%), Europa (3%) y América (3%). La tasa de tuberculosis ha descendido aproximadamente 1.5% por año desde 2000.<sup>2</sup>

La prevalencia de tuberculosis en 2015 fue 42% mas baja que en 1990. La reemergencia notable de la Tuberculosis fue impulsada por las deficiencias inmunitarias de personas con VIH, las cuales incrementaron grandemente el riesgo de que la infección latente de *Mycobacterium tuberculosis* progrese a enfermedad activa y sea transmitida a otros. El uso inadecuado de la terapia antituberculosa complica el problema, que conduce a la aparición y propagación de cepas farmacorresistentes y multifarmacorresistentes y una necesidad de implementación de estrategias de tratamiento más costosas. Es sabido por más de un siglo que la Tuberculosis es una enfermedad de pobreza, asociada con hacinamiento e inadecuada higiene.

De acuerdo con la información disponible en el componente de Tuberculosis del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en nuestro país se

registran cada año cerca de 15 mil casos nuevos de Tuberculosis pulmonar y cerca de dos mil defunciones por esta causa, lo que representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años.

En el año 2003, se diagnosticaron alrededor de 17 mil casos nuevos y casi 2 500 defunciones por esta causa. Al igual que en otros países, la epidemia de VIH/SIDA, la Diabetes mellitus, la Desnutrición, las Adicciones y la resistencia a fármacos antituberculosos agravan el Panorama Epidemiológico de la Tuberculosis en México.<sup>3</sup>

En México, la tendencia de la mortalidad por Tuberculosis todas las formas, ha mostrado un decremento; durante el período de 1941 a 1997 se presentó una reducción del 90.5% y en el período de 1990 a 1997 la reducción fue del 32.7%.

Según el registro y notificación del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Tuberculosis, en el año 2010 se reportó un total de 18 848 casos nuevos de Tuberculosis todas las formas en todo el país, correspondiendo a una tasa de incidencia de 16.8 casos por cada 100 mil habitantes. La tasa más elevada se ubicó en Baja California 54.1 casos, el resto de la tendencia por entidad federativa se demuestra en la gráfica en barras. La distribución por localización muestra que la mayor proporción de casos 81.6%, se encuentra en Tuberculosis pulmonar, con una tasa de 13.7 casos.

La tasa de incidencia nacional de Tuberculosis pulmonar se ubicó en 13.7 casos por cada 100 mil habitantes, con un total de casos nuevos de 15 384 las tres entidades federativas con las mayores tasas fueron: Baja California 42.4 casos, Tamaulipas 32.6 casos y Guerrero 29.3 casos.

El total de casos de Tuberculosis todas las formas, que presentaron alguna enfermedad asociada se registró en 19 491 casos. Se puede observar que el 58.6% de ellos 11 427 presentan alguna comorbilidad asociada y 505 casos 2.6% ignoran si la padecen.



De las patologías más frecuentemente asociadas se encuentra Diabetes mellitus (DM) en 21% 4 048 casos, Desnutrición con 2 716 casos 14% y la coinfección VIH/SIDA en 6% 1 189 casos.

De los 1 189 casos registrados con coinfección Tuberculosis/VIH, el 62% (738) de los casos presentaron una localización de tipo pulmonar, sin embargo, según criterios clínicos la localización de tipo miliar es considerada dentro de esta clasificación, por lo que al agregarlos, la clasificación pulmonar alcanzó un total de 843 casos 70.9%. Dentro de la clasificación otras formas, se ubican todas las demás localizaciones: intestinal o peritoneal, ósea, renal, genitourinaria, de piel, ojo, suprarrenal, ganglionar, pleural, otras, de tipo mixto y las no clasificadas o ignoradas; la proporción de estas otras localizaciones se ubicó en 23% 275 casos. La tasa de mortalidad de Tuberculosis todas las formas ha presentado una notoria disminución constante, sin embargo, en el año 2008 se reportó un incremento que para el siguiente año tuvo una caída.

La tasa de Tuberculosis todas las formas ha pasado de 8.0 a 2.1 defunciones por cada 100 mil habitantes y para Tuberculosis pulmonar de 6.5 a 1.7 defunciones.

En el año 2009 se registraron un total de 2 225 defunciones por Tuberculosis, de las cuales, el 69% correspondieron al sexo masculino (1 535 defunciones). La razón hombre, mujer se registró en 2.2 defunciones en varones por cada mujer fallecida.<sup>3</sup>

De las localizaciones reportadas, el 84.3% (1 875 defunciones) correspondieron a Tuberculosis respiratoria (confirmada y no confirmada bacteriológica e histológicamente). La razón de fallecimientos por Tuberculosis pulmonar-Tuberculosis del Sistema Nervioso se registró en 18.9 muertes por TBP, por cada defunción de Tuberculosis del Sistema Nervioso.

La proporción nacional de las defunciones por Tuberculosis todas las formas, respecto a las defunciones por todas las causas, fue inferior a uno de cada 100 (0.4%). La mitad del país registró cifras superiores a la media nacional y solamente Baja California registró una proporción mayor a uno (1.2%).

A nivel nacional el método diagnóstico más frecuentemente utilizado es la baciloscopía 75%, y en segundo lugar el histopatológico y radiológico (8% cada

uno). En general se diagnostican 9 casos de Tuberculosis con baciloscopía, por cada caso detectado con estos últimos métodos.

## TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO

El bacilo tuberculoso pertenece al orden de los Actinomycetales y a la familia Mycobacteriaceae que solamente contiene el género *Mycobacterium*. Dentro de éste género se han descrito más de 120 especies. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* engloba a un grupo de micobacterias que presentan más del 95% de homología en su ADN. Está compuesto por *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium canettii*.<sup>4</sup>

La alta concentración de G+C en el ADN de las especies de *Mycobacterium* se encuentra en el mismo rango de otros géneros que de igual manera contienen ácidos micólicos en su pared celular. Tales géneros incluyen *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Segniliparus*.

*Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo bacilar, ligeramente curvo que mide 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  por 1 a 10  $\mu\text{m}$ , es aerobio, no formador de esporas y sin motilidad. La morfología de la colonia bacteriana es variable y va desde lisas a rugosas y no pigmentadas hasta pigmentadas.<sup>5</sup>

El crecimiento de este microorganismo es lento, con tiempos de replicación por arriba de 20 horas en medios de cultivo convencionales. Aquellos microorganismos con tasas de crecimiento rápido requieren alrededor de 7 días en el medio de Löwenstein-Jensen, pero generalmente se requieren varias semanas para poder realizar un aislamiento microbiológico. El crecimiento de las micobacterias es estimulado por el dióxido de carbono y los ácidos grasos. La temperatura óptima de crecimiento varía entre los 30 y los 45°C.<sup>6</sup>

## LA CAPSULA DE MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Basados en los estudios ultraestructurales y bioquímicos más recientes de las micobacterias, la envoltura celular de la bacteria posee tres componentes: membrana plasmática, pared celular y cápsula.<sup>7</sup>

La membrana plasmática es la típica membrana de cualquier otra bacteria y aunque es vital para mantener los procesos homeostáticos de la bacteria, juega un rol poco importante en los procesos patológicos de MTB. La pared celular que rodea a la membrana plasmática es muy compleja y asemeja la pared de una bacteria Gram-negativa pero contiene en uno de sus polos una gran cantidad de lípidos (ésteres de micolato) quienes forman una barrera para moléculas polares.

La cubierta mas externa la envoltura celular consiste en una mezcla de polisacáridos, proteínas y lípidos y es llamada cápsula.

La pared celular es responsable de muchas de las propiedades características de las micobacterias (alcohol-resistencia y lento crecimiento). La estructura básica es característica de las bacterias Gram-negativas: una membrana citoplasmática interna cubierta con una gruesa capa de peptidoglucanos y sin membrana externa. El esqueleto de peptidoglucanos esta unido covalentemente con polisacáridos (arabinogalactosano) cuyos extremos terminales están esterificados con ácidos micólicos de alto peso molecular. Esta capa esta cubierta con polipéptidos y con una capa hidrófoba de ácidos micólicos muy antigénicos formada por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglucanos.<sup>8</sup>

## POLISACARIDOS CAPSULARES

Los mas importantes son los glucanos, un arabinomanano y un manano, y pequeñas concentraciones de otros. El glucano tiene una masa molecular aparente de 100 KDa, 1000 veces menor a la del glucógeno citosólico y está compuesta por unidades repetitivas de cinco o seis unidades de residuos 4- $\alpha$ -D-glucosil sustituidos en posición 6 con residuos mono o diglucosil.

El heteropolisacárido D-arabino-D-manano, tiene una masa molecular aparente de 13KDa y una estructura similar a la del lipoarabinomano y posee una cadena de manano compuesta por un núcleo 6- $\alpha$ -D-manosil-1-, sustituido en algunas posiciones 2 con unidades  $\alpha$ -D-manosil.<sup>8</sup>

## PROTEÍNAS CAPSULARES

Las proteínas capsulares son una mezcla compleja de polipéptidos, algunos de los cuales son proteínas sintetizadas y transportadas al medio extracelular, mientras que otras son proteínas citosólicas. Hasta el momento se han identificado más de 205 polipéptidos sin embargo, separarlos entre aquellos que son sintetizados y luego secretados hacia la superficie extracelular y los que se originan de las proteínas citosólicas una cuestión meramente académica y no funcional.<sup>9</sup>

## ROL DE LA CÁPSULA EN LA PATOGENICIDAD

La cápsula resulta de suma importancia en la patogenicidad de MTB debido a que participa en la internalización de la mycobacteria debido a que tiene una posición privilegiada entre el bacilo y la célula huésped.

## ADHESIÓN Y PENETRACIÓN A LA CÉLULA HUÉSPED

El crecimiento y replicación de MTB en los fagocitos son características bien documentadas de la patogénesis de esta bacteria y son críticas en el establecimiento de la infección, sin embargo, la colonización de otro tipo de células como epiteliales, endoteliales y fibroblastos juegan un rol en la colonización de tejidos profundos en los sitios de infección inicial y de los cuales se produce la diseminación.

Mediante estudios in vitro se comprobó que los bacilos de MTB se adhieren directamente (no relacionados con opsonización) y a través de opsoninas a un amplio rango de receptores entre los cuales se encuentran receptores del complemento tipos 1, 3 y 4, receptores de manosa, el receptor de la proteína A del surfactante, los receptores Fc y CD14.

La opsonización de MTB previo a la invasión de los macrófagos es otra de las vías de internalización del bacilo; este mediante el rescate de C2a para anclarlo a la C3 convertasa en sus superficie, resultando en la escisión y depósito de C3b y de este modo se activa la cascada del complemento.<sup>8</sup>

## RESISTENCIA A LAS DEFENSAS DEL HUESPED

La cápsula bacteriana impide la difusión de diferentes enzimas degradativas y péptidos bactericidas derivados del sistema inmune del huésped hacia el interior de la célula bacteriana. Los dominios ricos en lípidos de la cápsula asociados con el lado del micolato son resistentes a la degradación y además impermeables a las enzimas proteolíticas de los macrófagos. Otro fenómeno interesante es la inhibición de la fusión de los fagosomas y los lisosomas y el arresto de la maduración de fagosoma en un endosoma temprano, los cuales confieren resistencia a la función degradativa de los macrófagos.<sup>10</sup>

## FISIOPATOGENIA

### PANORAMA GENERAL DE LA RESPUESTA INMUNE A MTB

M. tuberculosis ingresa al organismo al inhalar los bacilos exalados de otro huésped infectado y de esta manera se depositan en los alveolos mas distales.<sup>11</sup>

Los bacilos de MTB infectan los macrófagos alveolares y así se inicia la respuesta inflamatoria temprana. Cuando la respuesta inmune del huésped se amplifica, el reclutamiento de células del sistema inmune innato provee a MTB de muchas más células a las cuales puede infectar contribuyendo así a la diseminación del microorganismo. Los macrófagos alveolares infectados son incapaces de matar a MTB debido a que no pueden llevar a cabo la fusión de los fagolisosomas. Debido a esto secretan una batería de citosinas proinflamatorias y quimiotácticas que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) quienes facilitan el reclutamiento de nuevos macrófagos y granulocitos al sitio de infección, esto es esencial para que se forme el centro del granuloma

constituído exclusivamente por macrófagos. A esto se le llama “granuloma innato”.

Posterior a la activación innata, las células dendríticas son reclutadas hacia el pulmón y transportan a las bacterias o a sus antígenos a los ganglios linfáticos mediastinales donde activan a las células T antígeno-específicas. Debido a la naturaleza de la infección por MTB, la mayoría de los bacilos y sus antígenos son transportados en endosomas y son reconocidos con mayor eficacia por el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II). MHC II facilita que las células Th1 migren hacia el pulmón y secreten interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Debido a que la mayoría de las células T implicadas en la respuesta inmune son CD4<sup>+</sup>, indirectamente también se induce la presencia de células T CD4<sup>8</sup>, generando colectivamente una respuesta inmune adaptativa tipo 1. La continua producción de citosinas en el pulmón por las células presentadoras de antígeno recluta nuevas células T hacia el pulmón y una vez que se encuentran ahí las células T rodean y “envuelven” a los macrófagos infectados activando a su vez sus funciones bactericidas y físicamente limitan la zona dañada para restringir la diseminación bacteriana y es de esta forma como se forma el “granuloma inmune”.<sup>12</sup>

La batalla continua entre la activación crónica inmune y la persistencia bacteriana ocasiona que los macrófagos adquieran una apariencia “epitelioide” o que se fusionen unos con otros originando células gigantes multinucleadas. Además, los mecanismos de virulencia de MTB genera el reclutamiento de nuevos macrófagos hacia el centro del granuloma quienes fagocitan los detritus celulares y los lípidos de las micobacterias dándoles una apariencia “espumosa”; estos macrófagos ricos en lípidos contribuyen a la persistencia de la infección por MTB. En los estadios finales de la evolución del granuloma, se puede observar encapsulación fibrótica o calcificación del mismo; constituyendo el “granuloma crónico”. Figura 1

Sin embargo, no está claro si la función de la cápsula fibrótica es prevenir el escape de la bacteria o limitar el acceso de nuevas células hacia el granuloma.<sup>13</sup>

## RESPUESTA INMUNE INNATA

MTB es controlada en la vía de entrada por macrófagos y neutrófilos como parte de la respuesta innata. Los macrófagos reconocen a la bacteria a través de sus receptores fagocíticos. La fagocitosis del bacilo por los macrófagos lo exponen al ambiente severo intracelular que es altamente ácido y con radicales superóxido y nitrilos<sup>14</sup>. Al contrario de lo que sucede con otras bacterias, MTB interactúa con los macrófagos para evitar su muerte por varios mecanismos:

- 1.- detiene la maduración del fagosoma evitando su fusión con los lisosomas.
- 2.- Las proteínas catalasa-peroxidasa y la hidroperóxidoreductasa alcalina protegen a la bacteria de los superóxidos tóxicos durante el estallido respiratorio.
- 3.- Algunas cepas virulentas de MTB son capaces de inducir apoptosis de los macrófagos que infectan resultando en necrosis tisular e infección de nuevos macrófagos.
- 4.- MTB puede manipular la secreción de citosinas del huésped para evitar ser eliminada.

Como parte de la respuesta innata, las células dendríticas notifican ciertos componentes de MTB (glicolípidos) a través de ciertos receptores de reconocimiento como los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de lecitina tipo C. A diferencia de los macrófagos, las células dendríticas no son capaces de favorecer la propagación de MTB a otras células. Después de su activación, las células dendríticas presentan los componentes procesados de MTB a las células T nativas en los ganglios linfáticos de drenaje principal. Además de los macrófagos y células dendríticas, los neutrófilos también juegan un rol importante en la respuesta innata a través de la producción no específica de IFN- $\gamma$  especialmente en las etapas tempranas de la infección.<sup>15</sup>

## RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

LA respuesta adaptativa hacia MTB incluye tanto la inmunidad celular como la humoral. Los antígenos de MTB son presentados por el CMH clase II a las células CD4 para su activación. Mientras tanto, los antígenos exógenos de MTB activan a las células CD8 a través del CMH clase I. Las células CD4 tienen un rol predominantemente inmunomodulador removiendo las células presentadoras de antígeno infectadas, a diferencia de las CD8 quienes contribuyen directamente en la eliminación de las células infectadas. Después de la activación de las células T y su expansión clonal, las células efectoras T activadas disminuyen en número hasta solo ser una pequeña proporción que se transformarán en células T de memoria. Algunas de estas células de memoria residen en los sitios de infección como células T de memoria efectoras mientras que otras migran a los ganglios cercanos para ser células T de memoria centrales. Así, cuando se detecte nuevamente antígenos de MTB, las células T de memoria centrales proliferan y se diferencian rápidamente en células T efectoras para eliminarlos.

Las células T CD4 colaboradoras tipo 1 (Th1) son críticas en la eliminación de patógenos intracelulares. Estas células secretan IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  para activar y reclutar células de la respuesta innata, así como para activar a otras células T.

Las células TH17 son un subtipo de células T CD4 importantes en el control de MTB. Éstas producen IL-17 quien desencadena el reclutamiento de neutrófilos y CD4 productoras de IFN- $\gamma$

Al contrario de las células Th1, las células T colaboradoras tipo 2 (Th2) juegan un rol negativo en el control de MTB al activar la secreción de IL-4, IL-5, IL-10 quienes inhiben la respuesta Th1.

Las células T CD8 juegan un rol importante también en este tipo de respuesta; estas células eliminan a MTB directamente por la liberación de gránulos o indirectamente mediante la lisis del macrófago o la célula dendrítica infectados. La citólisis se produce mediante la exocitosis de gránulos que contienen granzima



A/B y perforina y a través de la muerte celular a través de la agregación de Fas en la célula blanco mediante FasL.<sup>16</sup>

## MECANISMOS SUBCELULARES DE LA PATOGÉNESIS TUBERCULOSA

### INFECCIÓN MACROFÁGICA

MTB puede usar numerosos receptores de los fagocitos para infectarlos, entre ellos se encuentran los receptores de lectina tipo C, los receptores tipo “basurero” y los receptores del complemento. De todos ellos los mas estudiados son los primeros y de ellos los mas importantes son el receptor de macrófagos para manosa y la dectina 1 quienes reconocen abundantes lipoglicanos de la pared celular y lipoarabinomananos.

### ARRESTO DE LA MADURACIÓN DEL FAGOSOMA

La capacidad de replicación dentro del macrófago es una de las características que le proporcionan a MTB su latencia. La estrategia usada por MTB para sobrevivir y replicarse dentro del macrófago esta basada en su habilidad para detener la maduración del fagosoma en su estado de endosoma temprano, bloqueando la fusión de sus vesículas entre los estados controlados por Rab5 y Rab7. Esto permite a la bacteria limitar la acidificación del lisosoma, tener acceso a los nutrientes presentes en el compartimiento endosomal y evitar la liberación del contenido lisosomal.<sup>17</sup>

El fagosoma de MTB se caracteriza por una retención prolongada de los marcadores del endosoma temprano quienes son normalmente reutilizados de la superficie del fagosoma maduro, y numerosos endosomas tardíos o marcadores lisosomales se encuentran disminuídos o ausentes. Los últimos marcadores incluyen la V-ATPasa quien produce un fallo en la acidificación del fagosoma de MTB. Este arresto temprano del endosoma esta diseñado para permitir a la bacteria adquirir nutrientes (como el hierro) a través del reciclado de endosomas mientras se evita el ambiente degradativo y ácido del lisosoma.

Numerosos lípidos y proteínas efectoras de la bacteria modulan la maduración del fagosoma. La maduración del mismo requiere la conversión de Rab5 a su forma activa, GTP-Rab7 y la producción de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en la membrana del fagosoma, éstos últimos se encuentran dañados en el fagosoma de MTB.

Dos de los efectores secretados por MTB, PtpA y NdkA, pueden ser los responsables de la ausencia de Rab7 en el fagosoma: PtpA (una tirosina-fosfatasa) desfosforila el complejo Vps33B del huésped, un componente de la fusión homotípica y del complejo de clasificación de proteínas, quien es crítica para la activación de Rab7. KdkA actúa como una proteína activadora de guanosina-fosfatasa y puede catalizar la conversión de GTP a GDP en Rab7 para hacerla inactiva.

Además, se sabe que los fagosomas de MTB contienen bajas cantidades de PI3P y se presume que se debe a que el componente de la pared celular ManLAM puede interrumpir la cascada de señalización de la calmodulina-calcio dependiente.<sup>11</sup>

## DAÑO DE LA MEMBRANA DEL FAGOSOMA Y ESCAPE BACTERIANO

El paradigma de la infección del macrófago por MTB es su capacidad de residir en el fagosoma por el resto del proceso infeccioso. Sin embargo, se sabe que MTB puede escapar del fagosoma teniendo acceso al citoplasma de la célula infectada induciendo la apoptosis de los macrófagos y de esta manera contribuyendo a la diseminación de la bacteria célula-célula en un proceso que implica la participación del sistema de secreción ESX-1 tipo VII. Este sistema produce un daño en la membrana del fagosoma haciendo de esta manera posible que MTB se replique en el citosol. Los efectores para que esto se produzca (Esx-A/ESAT-6 y Esx-B/CFP-10) tienen actividad lítica sobre la membrana del fagosoma.<sup>11</sup>

## MUERTE CELULAR

Tanto la respuesta inmune del huésped como los mecanismos de virulencia de MTB contribuyen a la presencia de necrosis y apoptosis. El tipo de necrosis presente en la infección por MTB es la caseosa y generalmente entre los restos celulares de macrófagos es donde se encuentra el mayor número de bacterias viables.

MTB es capaz de inducir apoptosis con un mecanismo dependiente de ESX-1, probablemente a través de su acceso al citoplasma de la célula infectada y la interacción subsecuente entre los componentes de la superficie como la proteína HBHA con la superficie de la mitocondria. Una vez desencadenada la cascada de apoptosis, como paso final se generan cuerpos apoptóticos que contienen bacilos de MTB los cuales son fagocitados por otros macrófagos sin exponer a la bacteria al medio extracelular facilitando la diseminación entre célula y célula.<sup>18</sup>

## DISEMINACIÓN

La diseminación hematogena resulta de la colonización de los lóbulos que no estaban previamente infectados y el establecimiento de la enfermedad extrapulmonar. La diseminación a los ganglios linfáticos es un punto clave en el desarrollo de la respuesta inmune adquirida.

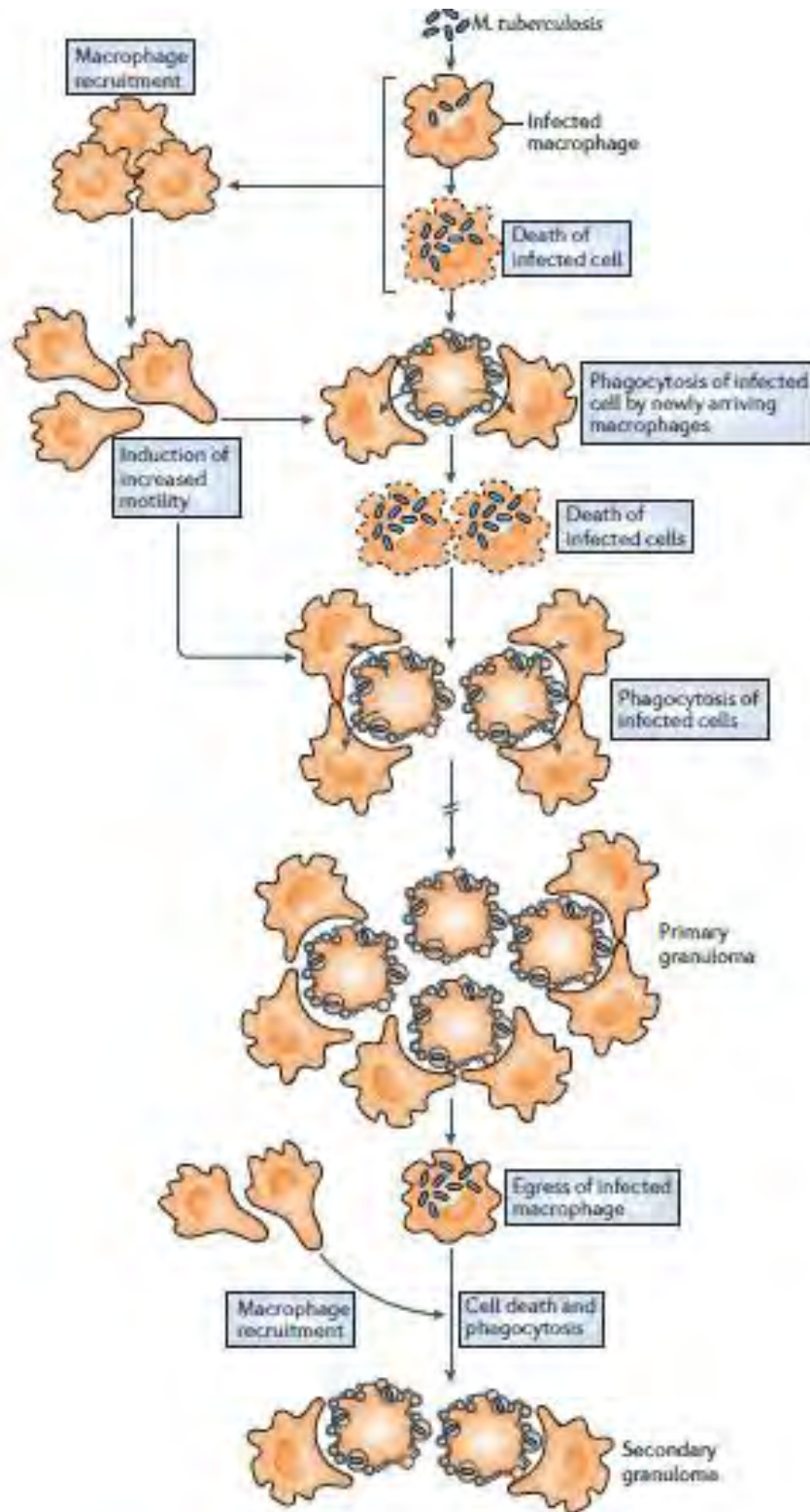


FIGURA1: mecanismos fisiopatogénicos para la formación del granuloma

## EL GRANULOMA

La respuesta inflamatoria hacia MTB esta constituida principalmente por células, entre ellas las más importantes son los macrófagos epitelioides sin embargo, también se encuentran linfocitos, células plasmáticas, células dendríticas, neutrófilos y cierto grado de necrosis.

Los macrófagos epitelioides son células fagocíticas de gran tamaño que tienen abundante citoplasma y pueden algunas veces coalescer para formar células gigantes multinucleadas. Este proceso se puede autolimitar y formar un granuloma o puede infiltrar el tejido adyacente y constituir la llamada inflamación crónica granulomatosa.

Un granuloma se define como un agregado de células del sistema inmunológico que bajo el microscopio aparecen como macrófagos epitelioides.<sup>12,19</sup>

Los macrófagos del granuloma exhiben múltiples fenotipos, como son macrófagos maduros, macrófagos epitelioides, macrófagos espumosos y células gigantes multinucleadas tipo Langhans.

Las bacterias se localizan con mayor frecuencia en el centro necrótico el cual contiene la mayoría de los macrófagos necróticos.

Otros tipos de células también forman parte de un granuloma, entre ellas se encuentran neutrófilos, células dendríticas, linfocitos T, B y NK y fibroblastos.<sup>18, 20,</sup>

<sup>21, 22.</sup> Figura 2

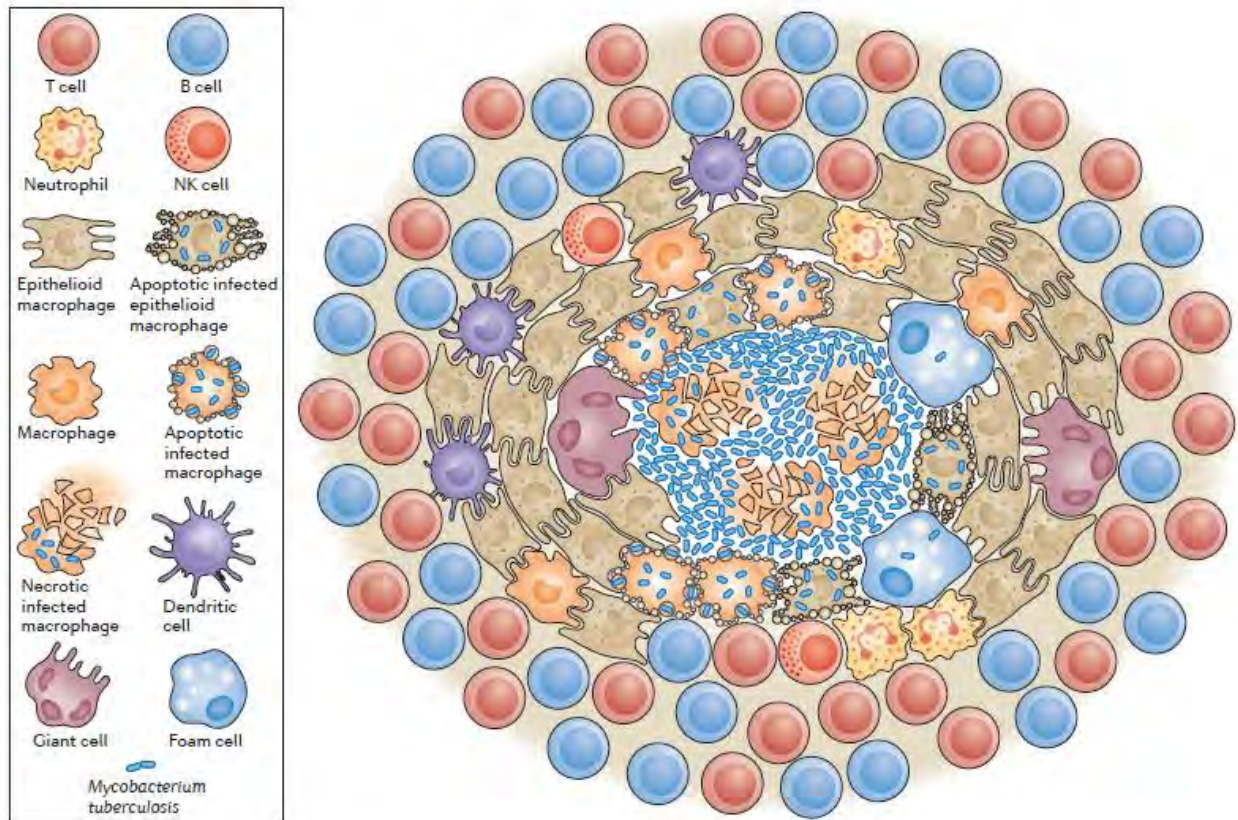


Figura 2: representación esquemática de un granuloma y sus constituyentes

Numerosos receptores de las células fagocíticas captan a las micobacterias, entre ellos se encuentran los receptores tipo C de las lecitinas (CLRs), los tipo “basurero” (SRs) y los derivados del sistema del complemento (CRs). Los principales CLRs incluyen el receptor macrofágico de manosa y la Dectina 1; el primero de ellos reconoce muchas de las estructuras de la pared celular como lipoglicanos y lipoarabinomananos mientras que del segundo se desconoce.<sup>18</sup> Una vez que ingieren bacterias, las células fagocíticas se transportan al intersticio pulmonar.

## MÉTODOS HISTOLÓGICOS DE DIAGNÓSTICO

La tuberculosis extrapulmonar representa del 10 al 15% de los casos y cada vez se estima que esta cifra se incrementa debido a la asociación con VIH. Por ello, el diagnóstico histológico de la tuberculosis juega un papel importante en la patología infecciosa.<sup>23</sup>

Considerando las limitaciones de sensibilidad y especificidad de la tinción de Ziehl-Neelsen, el cultivo y los métodos serológicos y moleculares, el análisis histomorfológico es el único método para el diagnóstico de la tuberculosis en algunos pacientes.

La respuesta granulomatosa e incluso en algunos casos aquella no granulomatosa con macrófagos espumosos solo se puede considerar secundaria a infección por *M. tuberculosis* si se confirma la presencia del bacilo en el tejido. Así mismo, la presencia de granulomas con necrosis caseosa es altamente sugestiva de infección por MTB.<sup>24</sup>

### ZIEHL-NEELEN

Desde que se descubrió el agente etiológico de la tuberculosis surgió gran incertidumbre por idear métodos diagnósticos certeros y de fácil acceso para la identificación del bacilo. No fue hasta 1882 cuando Robert Koch descubrió el bacilo de la tuberculosis en muestras clínicas utilizando el método de Carl Weigert y realizándole algunas modificaciones. Posteriormente otros investigadores de la época realizaron algunas adaptaciones y mejoras al método de Koch entre los cuales se encuentran los siguientes; Paul Ehrlich en 1886 desarrolló el método de la hemotoxilina con alumbre. Posteriormente Franz Ziehl modificó el método de Ehrlich utilizando ácido carbólico (fenol) como mordiente. Subsecuentemente Friedrich Neelsen cambió la tinción primaria sustituyéndola por fuchsina básica y mantuvo la solución mordiente. Así fue como surgió el método Ziehl-Neelsen a

mediados de 1890 cuya característica principal es el empleo de calor para que el colorante primario penetre la pared celular del bacilo.<sup>25</sup>

Bajo condiciones adecuadas, el número mínimo de bacilos que se necesitan para que esta tinción pueda detectar solo un microorganismo es de  $10^4$  a  $10^5$  bacilos por mililitro de expectoración; siendo este número equiparable al necesario en muestras histológicas. Sin embargo y a pesar de todos los esfuerzos por unificar y estandarizar el método, la tinción de ZN tiene una sensibilidad baja (22-43%).<sup>26</sup>

A pesar de que es un método relativamente sencillo son múltiples los factores que llevan al resultado de falsos positivos tanto del proceso preanalítico y analítico y además son inherentes a un número infinito de factores que tienen relación a la preparación de la tinción como tal (tiempo de tinción, calidad de los reactivos, experiencia del técnico y características propias del espécimen) haciendo muy difícil la interpretación de los resultados y además que son observador dependiente.<sup>27, 28</sup>

## INMUNOHISTOQUÍMICA

La identificación de patógenos por medio de los métodos de inmunohistoquímica ha sido usada por más de medio siglo, y existen múltiples estudios que prueban su utilidad en la detección de micobacterias en tejidos fijados en parafina.<sup>30, 31, 32, 33, 34, 35</sup>

El anticuerpo ideal para la identificación de micobacterias debe de ser altamente sensible y tener la capacidad de identificar a la mayoría de las especies debido al incremento en el número de micobacterias no tuberculosas causantes de enfermedad en pacientes inmunosuprimidos. Por fortuna, actualmente existen anticuerpos con altas tasas de sensibilidad, sin embargo, este incremento en la sensibilidad también se acompaña de un índice elevado de falsos positivos; lo anterior es crítico para el patólogo pues es preferible no subdiagnosticar un caso pues los falsos positivos pueden corroborarse con otros métodos (cultivo, amplificación de ácidos nucleicos, respuesta a antibioticoterapia).<sup>36</sup>



La detección de micobacterias mediante inmunohistoquímica es un procedimiento simple y sencillo que ha sido usado para identificar microorganismos porcedentes de cultivo, expectoración así como de tejido. Anticuerpos monoclonales y policlonales se han usado contra varios componentes de la micobacteria y muchos de ellos existen comercialmente. La sensibilidad del procedimiento de inmunohistoquímica depende de varios factores como la distribución de los antígenos en el granuloma, el estadio clínico de la enfermedad, duración del tratamiento antifímico recibido previo a la biopsia y la especificidad del anticuerpo usado.<sup>37</sup>

## METODOLOGÍA

### PROBLEMA

¿Es plausible incrementar la sensibilidad de las tinciones Ziehl-Neelsen e inmunohistoquímica para *M. tuberculosis* al realizarse las dos pruebas simultáneamente tanto en granulomas pulmonares como en extrapulmonares?

### JUSTIFICACIÓN

La identificación de bacilos ácido alcohol-resistentes en tejido es problemática y la dificultad de ello radica tanto en puntos críticos de la fase preanalítica (procesamiento del tejido, calidad de los colorantes, corte, etc) como de la fase analítica (colorante precipitado, experiencia del observador, etc). El presente trabajo pretende corroborar la eficacia de las tinciones ZN y MTB al realizarlas simultáneamente en un espécimen para detectar tanto bacilos como sus componentes antigénicos; tratando de explotar las virtudes que cada método ofrece y disminuir al mínimo los inconvenientes con los que cuentan.

### HIPÓTESIS

La prueba ZN/MTB incrementará la detección de Bacilos ácido-alcohol resistentes en comparación con la técnica de ZN y MTB en pacientes con tuberculosis.

### OBJETIVO

Comparar prueba EST contra la tinción de Ziehl-Neelsen y la prueba de inmunohistoquímica para incrementar la detección de bacilos en pacientes con tuberculosis.

### SUJETOS DE ESTUDIO:

UNIVERSO: pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

MUESTRA: pacientes con diagnóstico clínico y microbiológico de tuberculosis

## TEMPORALIDAD DEL ESTUDIO

Estudio retrospectivo, comparativo y analítico

## CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Diagnóstico de tuberculosis corroborado con prueba terapéutica y cultivo
- Biopsia obtenida en el Instituto
- Material suficiente para la realización de 3 cortes

## CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Biopsia con más de 90% de necrosis
- Coinfección con algún otro microorganismo

## VARIABLES

### INDEPENDIENTES

TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN: dicotómica, nominal, expresada como positivo o negativo.

INMUNOHISTOQUÍMICA: dicotómica, nominal, expresada como positivo o negativo.

PRUEBA EST: nominal, expresada como positiva a Ziehl-Neelsen, positiva a Inmunohistoquímica, positiva a ambas o negativa.

### DEPENDIENTES

INFLAMACIÓN GRANULOMATOSA: dicotómica, nominal, expresada como presente o ausente.

## **PROCEDIMIENTO**

### **PACIENTES Y MUESTRAS**

El presente estudio es retrospectivo y consistió en la evaluación del material con el que se cuenta en el departamento de Patología de aquellos pacientes que cuenten con el diagnóstico de tuberculosis (estándar de oro prueba terapéutica o cultivo) en el periodo comprendido entre los años 2005 y 2010.

Se escogieron 32 casos y se distribuyeron en dos grupos: tuberculosis pulmonar y tuberculosis extrapulmonar (linfática, intestinal y otras). Los cortes iniciales fueron revisados y se escogió la laminilla que tuviera mas granulomas y necrosis caseosa.

Otros 20 casos control fueron incluidos de un grupo de pacientes sin diagnóstico de tuberculosis y que sus cortes mostraran inflamación crónica granulomatosa pero de tipo a cuerpo extraño; los tejidos de este grupo fueron variados e incluyeron pulmón, piel y epiplón.

Todas las interpretaciones fueron realizadas solo por una persona y se llevó a cabo una revisión por otro patólogo de una muestra determinada de casos

### **TINCIÓN ZIEHL-NEELSEN**

Se realizó utilizando la técnica tradicional. Se obtuvieron cortes de 4µm de espesor, se desparafinaron y posteriormente se les aplicó el colorante Fuchina alcohólica por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se decoloraron con una solución de alcohol ácido y posteriormente se contrastaron con azul de metileno. Se hizo una búsqueda inicial de BAAR a 40X se corroboraron a 100X.

### **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Se utilizó el anticuerpo anti-TB de la casa comercial BioCare Medical® CP140 PP 140AA a una dilución de 1:500. Se utilizaron cortes de 4µm de espesor las cuales

se desparafinaron y posteriormente hidrataron. Después de recuperar el antígeno, se aplicó el anticuerpo primario por 30 minutos a temperatura ambiente. Para la visualización se utilizó 3,3'-diaminobencidina por 5 minutos. Los cortes fueron contrastados con HE. En cada caso se incluyó un control positivo (granuloma pulmonar). La expresión del antígeno fue examinada bajo 40X. Se consideró positivo aquel caso que presentara parches irregulares de gránulos café-oscuros y que estuvieran localizados exclusivamente en la zona necrótica.

### TINCIÓN ZN/MTB

Se utilizó el método desarrollado por Che et al<sup>38</sup>, el cual esta baso en los principios de las tinciones de ZN y los procedimientos de inmunohistoquímica para detectar BAAR y antígenos de MTB en una misma laminilla. El procedimiento consiste en lo siguiente: desparafinación, rehidratación, recuperación del antígeno, aplicación del anticuerpo y visualización con DAB, posteriormente a las laminillas se les aplica Fuschina alcohólica por 20 minutos seguido de la aplicación del alcohol-ácido. Posterior al lavado con agua destilada, los cortes se contrastan con HE. La expresión del antígeno fue evaluada bajo 40X y la presencia de BAAR y se corroboró a 100X.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El rendimiento de cada una de las tinciones fue capturado en una base de datos. Se realizó un análisis descriptivo de cada una de las variables utilizando el paquete estadístico STATA v. 11.1 resumiendo los datos con medidas de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar o rango intercuartílico) según su tipo de distribución, si son variables cuantitativas; y con porcentajes si son variables cualitativas. La prueba  $\chi^2$  de Pearson se utilizó para determinar la significancia de cada una de las variables categóricas. Se consideró estadísticamente significativo aquel valor de  $p < 0.05$ .

## ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se apegó a los lineamientos de la Ley General de Salud, en el Título Quinto “Investigación para la Salud”, Capítulo único, artículos 96 a 103.

Este estudio no contempló ningún método invasivo, corresponde por lo tanto a una investigación sin riesgo según lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, Título Segundo “De los Aspectos éticos de la Investigación en Seres humanos”, artículo 17, fracción I. Por tratarse de investigación sin riesgo, no fue necesario obtener consentimiento informado, según artículo 23 del Reglamento mencionado.

## RESULTADOS

Se estudiaron 32 biopsias de 32 pacientes (18 hombres y 14 mujeres) con diagnóstico de tuberculosis. La mayoría de las biopsias fueron de pulmón 16/32 (51.61%) seguido de ganglio linfático 7/32 (21.88%) (Tabla 1).

**Tabla 1:** Características generales de pacientes con tuberculosis

	<b>Total</b>	<b>Hombres</b>	<b>Mujeres</b>
Edad	38±13.58	40.2±15.44	35±10.56
Tipo de tejido			
Pulmón	16 (50%)	7 (38.89)	9 (64.24%)
Ganglio linfático	7 (21.88%)	4 (22.22%)	3 (21.43%)
Pleura	2 (6.25%)	2 (11.11%)	0
Epiplón	2 (6.25%)	1 (5.56%)	1 (7.14%)
Otros	5 (15.62%)	4 (22.22)	1 (7.14%)
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>18(56.25%)</b>	<b>14 (43.75)</b>

Del total de biopsias estudiadas, en 75 % de los casos se documentó la presencia de granulomas con histiocitos epitelioides y células gigantes multinucleadas y un centro constituido por necrosis caseosa; en los 8 casos restantes sólo se observaron granulomas sin necrosis central (Tabla 2).

**Tabla 2:** Tipo de respuesta inflamatoria en pacientes con tuberculosis

<b>Respuesta inflamatoria</b>	<b>Total</b>	<b>Hombres</b>	<b>Mujeres</b>
Granulomatosa con necrosis caseosa	24 (75%)	14 (77.78%)	10 (71.43%)
Granulomatosa sin necrosis caseosa	8 (25%)	4 (22.22%)	4 (28.57%)

Al examen microscópico de los 20 casos control, se observó que la mayoría contenían inflamación crónica granulomatosa tipo cuerpo extraño (material de sutura, minerales, etc) sin histiocitos epitelioides o necrosis caseosa. Sin embargo,

al investigar la presencia de mycobacterias se documentó la prueba positiva en un caso con ZN y con la prueba ST y cuatro con la reacción de inmunohistoquímica.

De los 32 casos, sólo se identificaron bacilos ácido-alcohol resistentes en el 78.13% (25) con el método tradicional (ZN), a diferencia del método de inmunohistoquímica donde sólo se logró identificar inmunorreactividad en el 62.5%; el patrón de tinción fue granular fino de localización variable pero predominantemente en la periferia del granuloma y en menor cantidad en las zonas necróticas. El patrón tintorial en las micobacterias es uniforme y aparecen como estructuras bacilares más anchas que largas (Tabla 3) (Figura 3).

**Tabla 3:** Rendimiento diagnóstico de las pruebas ZN, IHQ y ZN/IHQ

	Ziehl-Neelsen	Inmunohistoquímica	ZN/IHQ
Pacientes con tuberculosis	25 (78.13%)	20 (62.5%)	29 (90.6%)
Pacientes control	1 (5%)	4 (20%)	1 (5%)

Con la doble tinción ZN/IHQ se incrementa el número de casos positivos en comparación con las dos técnicas aisladas hasta 90.6% de los casos positivos. Al comparar la asociación de los casos positivos de los tres métodos con el tipo de granuloma (con necrosis caseosa o sin ella) y el tipo de tejido se corrobora que los casos positivos son aquellos que tienen granulomas bien formados con necrosis caseosa central y que el tipo de tejido que más positivos tiene es el pulmón (esto por ser mayoritario en la muestra). Tabla 4

**Tabla 4:** Rendimiento de las pruebas por tipo de tejido e inflamación

	ZN positivo	IHQ positivo	ZN/IHQ positivo
Respuesta inflamatoria			
Granulomatosa con necrosis caseosa	20 (80%)	18 (90%)	24 (82.76%)
Granulomatosa sin necrosis caseosa	5 (20%)	2 (10%)	5 (17.24%)
Tipo de tejido			
Pulmón	12/16 (75%)	11/16 (69%)	15/16 (93.7%)
Ganglio linfático	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)
Pleura	1/2 (50%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)
Epiplón	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
Otros	2/5 (40%)	1/5 (20%)	3/5 (60%)



Al comparar el rendimiento diagnóstico de cada una de las pruebas encontramos que la más sensible es la prueba ZN/MTB (90.63%). De igual manera, la que tiene el cociente de probabilidad positivo más alto es la prueba ZN/MTB (19.03) seguido del ZN (16.41) y finalmente la inmunohistoquímica (13.13). Por otro lado, la prueba con el cociente de probabilidad negativo más alto es la inmunohistoquímica (0.39) y aquella con el más bajo es la prueba ZN/IHQ (0.10) (Tabla 5).

**Tabla 5:** Rendimiento detallado de las pruebas ZN, IHQ y ZN/IHQ

	<b>ZN (IC95%)</b>	<b>IHQ (IC95%)</b>	<b>ZN/IHQ (IC95%)</b>
<b>Diagnosticados correctamente</b>	84.91% (71.85-92.81%)	69.23% (54.74-80.88%)	92.45% (80.93-97.55%)
<b>Sensibilidad</b>	78.13% (59.56-90.06%)	62.50% (43.75-78.34%)	90.63% (73.83-97.55%)
<b>Especificidad</b>	95.24% (74.13-99.75%)	80.00% (55.73-93.39%)	95.24% (74.13-99.75%)
<b>Valor predictivo positivo</b>	96.15% (78.42-99.80%)	83.33% (61.81-94.52%)	96.67% (80.95-99.83%)
<b>Valor predictivo negativo</b>	74.07% (53.41-88.13%)	57.14% (37.43-74.97%)	86.96% (65.33- 96.57%)
<b>Cociente de probabilidades positivo</b>	16.41 (2.40-112.08)	3.13 (1.25-7.82)	19.03 (2.80-129.29)
<b>Cociente de probabilidades negativo</b>	0.23 (0.12-0.45)	0.47 (0.28-0.77)	0.10 (0.03-0.29)

De los casos que fueron ZN negativos, con IHQ se logró identificar 1, y con la doble técnica ZN/IHQ 6 más. Así mismo, de los casos IHQ negativos, con la doble técnica ZN/IHQ se identificaron 10 más. Tablas 6 y 7.

**Tabla 6:** Comparación de IHQ y ZN/IHQ contra ZN

	<b>IHQ</b>		<b>ZN/IHQ</b>			
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>ZN positivo</b>	<b>IHQ positivo</b>	<b>Ambos positivos</b>	<b>Negativo</b>
<b>ZN positivo</b>	19 (76%)	6 (24%)	5 (20%)	4 (16%)	14 (56%)	2 (2%)
<b>Zn negativo</b>	1 (14.29%)	6 (85.71%)	1 (14.29%)	1 (14.29%)	4 (57.14%)	1 (14.29%)

**Tabla 7:** Comparación de ZN/IHQ contra IHQ

	<b>ZN/IHQ</b>			
	<b>ZN positivo</b>	<b>IHQ positivo</b>	<b>Ambos positivos</b>	<b>Negativo</b>
<b>IHQ positivo</b>	2 (10%)	4 (20%)	13 (65%)	1 (5%)
<b>IHQ negativo</b>	4 (33.33%)	1 (8.33%)	5 (41.67%)	2 (16.67%)

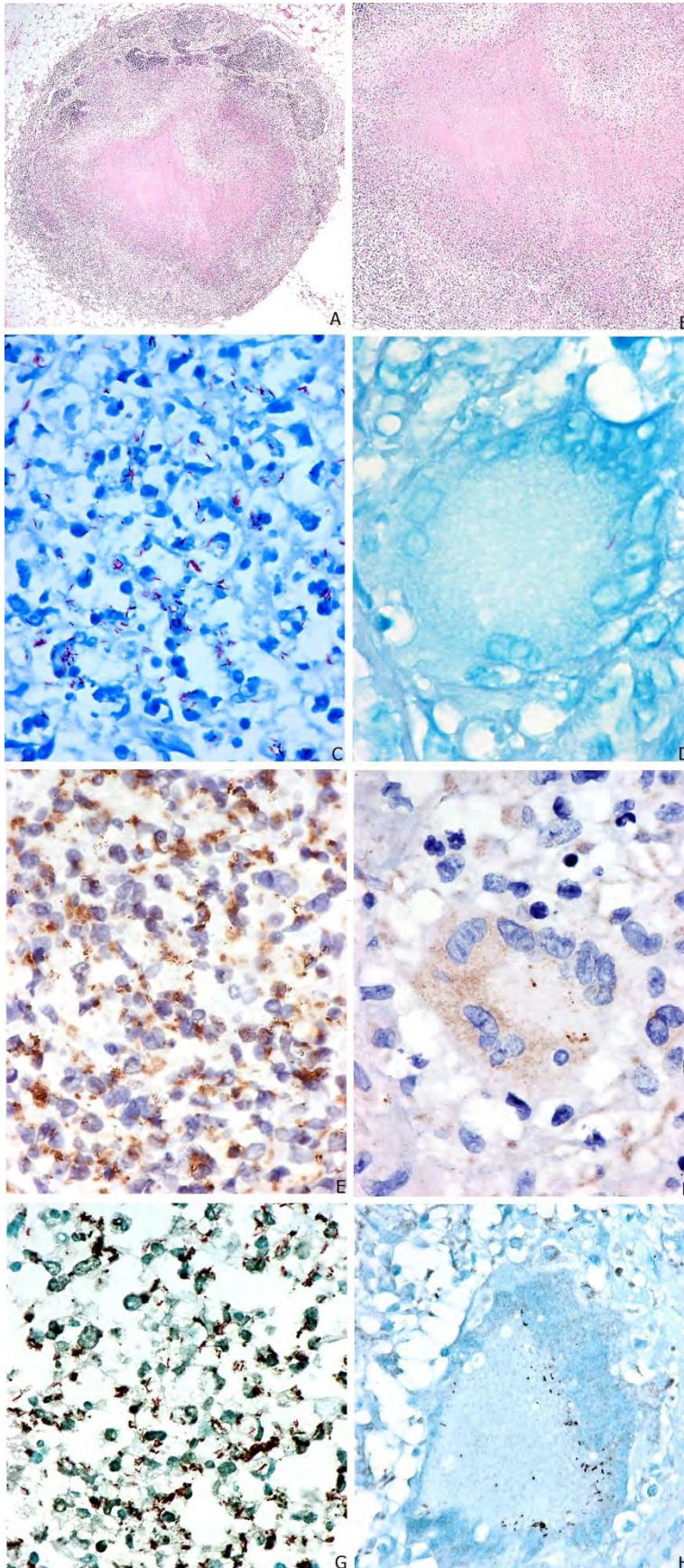


Figura 3:

Fotomicrografías de los cortes examinados con tinción convencional y de cada una de las técnicas.

A y B: ganglio linfático con pérdida de la arquitectura normal con necrosis caseosa en su centro. (H&E 4X)

C: tinción de Ziehl-Neelsen en la que se observan abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes (ZN 100X).

D: tinción de Ziehl-Neelsen de una célula gigante multinucleada con un bacilo en su interior (ZN 100X)

E: Inmunohistoquímica contra MTB, se observa el patrón granular uniforme y disperso, también se identifican algunos bacilos con inmunomarcación. (100X)

F: gran aumento de una célula gigante multinucleada con gran cantidad de antígenos de MTB en su interior (100X)

G: doble tinción ZN/IHQ, se observan abundantes depósitos granulares finos que contrastan con bacilos ácido-alcohol resistentes (100X)

H: gran aumento de una célula gigante multinucleada conteniendo antígenos de MTB y bacilos en su interior (100X)

## DISCUSIÓN

El papel diagnóstico de la inmunohistoquímica ha virado de ser un método útil en la identificación de tumores a ser una herramienta importante en la identificación de microorganismos. Debido a que los métodos tradicionales son observador-dependientes, cada vez son más los estudios en los que se menciona su superioridad con respecto a las técnicas de histoquímica e incluso que la inmunofluorescencia.<sup>39, 40, 41, 42, 43</sup>

En nuestro estudio, sin embargo, el rendimiento diagnóstico de la IHQ en comparación con el ZN fue bajo; lo cual se pudiera explicar debido a que la mayoría de los estudios realizados utilizan un anticuerpo monoclonal contra un antígeno específico de la pared celular de la mycobacteria, a diferencia del nuestro que es un anticuerpo policlonal mucho menos sensible.

Es interesante el resultado obtenido con la técnica ZN/IHQ y dado que los pioneros de éste método (Che N. et al)<sup>38</sup> son los únicos en implementarlo hasta este momento, este trabajo es pionero en la implementación del mismo. A diferencia de ellos, que utilizaron un anticuerpo específico y que ellos mismos sintetizaron, el patrón de expresión e inmunorreactividad del nuestro (que es policlonal y de una casa comercial) es diferente. Estos investigadores reportan que su anticuerpo se observa sobre todo en las zonas de necrosis caseosa debido a que su anticuerpo está dirigido hacia el antígeno Ag85B, que es una proteína que forma parte de un complejo encargado de acoplar ácidos micólicos al arabinogalactano de la pared celular, y debido a que al inducir la apoptosis y necrosis de los macrófagos que infecta, MTB queda expuesta al medio ambiente del granuloma y al ser una proteína de gran peso molecular, se queda depositada en esta localización.<sup>42</sup>

Observamos que la localización de la positividad mediante IHQ es predominantemente en la periferia del granuloma, específicamente en la localización de los histiocitos; esto se pudiera explicar por la premisa de que al utilizar un anticuerpo policlonal se esperaría reactividad con más epítopes,

además de que al ser presentados los antígenos hacia las células dendríticas del granuloma éstas son las que mostrarían mayor cantidad de restos de MTB y por lo tanto la expresión del antígeno estaría mayoritariamente en la localización de éstas células en el granuloma (hacia la periferia).

La sensibilidad de la prueba ZN/IHQ es mayor comparada con las dos separadas, al igual que lo observado por los creadores de ésta técnica. Resulta interesante que de los casos que habían sido ZN e IHQ negativos, con éste método se interpretaron como positivos. Debido a que la interpretación del ZN se debe realizar a grandes aumentos y que la probabilidad de identificar un bacilo depende de la cantidad de éstos, identificar gran cantidad de restos inmunogénicos de MTB por IHQ rodeando a una cantidad mínima de bacilos es de gran utilidad al momento de interpretar la prueba; de este modo se puede empezar a rastrear la laminilla con el objetivo de seco débil (100X) e interpretar con mayores aumentos las zonas más sospechosas de inmunorreacción en busca de bacilos.

Con base en los fundamentos de cada técnica por separado, la detección de bacilos por medio de ZN requiere de un número mínimo de bacilos en el tejido y además que éstos bacilos estén intactos; dependiendo del anticuerpo que se use, la identificación de antígenos de MTB es más probable que la observación de bacilos como tal sin que esto sea una premisa. Por lo tanto, explotar las bondades de cada una de las técnicas es muy ventajoso al momento de evaluar tejidos con poca respuesta granulomatosa y con una cantidad de bacilos escasa.

No encontramos asociación entre el tipo de tejido evaluado y la positividad de cada una de las pruebas. Si bien, existen informes donde se menciona que es más benéfico realizar IHQ en ganglio linfático que en otros tejidos por la posibilidad de falsos positivos por tinción de fondo y la inmunorreacción cruzada con otros antígenos.

## **CONCLUSIONES**

La prueba ZN/IHQ tiene mejor rendimiento diagnóstico en comparación con ZN e IHQ por separado.

El método de inmunohistoquímica presenta menor rendimiento diagnóstico en comparación con ZN, pero la prueba combinada supera al ZN e IHQ por separado.

Las tasas de positividad dependen de la cantidad de bacilos y de la respuesta granulomatosa que se observe.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Dheda K, Barry CE, Maartens G. Tuberculosis. *Lancet*. 2016 Mar 19;387(10024):1211-26.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report. 2015. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2015.
3. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología. Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. México D.F. 2012.
4. Truffot-Pernot C, Veziris N. Bacteriological tests for tuberculosis. *Rev Mal Respir*. 2011 Oct;28(8):1034-47.
5. João Bento, Anabela Santos Silva, Filomena Rodrigues, Raquel Duarte. Métodos diagnósticos em tuberculose. *Acta Med Port* 2011; 24: 145-154
6. Luis Torroba Álvarez. Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2007 Vol. 30, Suplemento 2.
7. Daffé M, Etienne G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis*. 1999;79(3):153-69.
8. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol*. 1997 Dec;1(4):579-88.
9. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(1-3):91-7.
10. Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, Pradl L, Jörg S, Krenn V, Morawietz L, Kaufmann SH, Aichele P. Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. *J Infect Dis*. 2003 Nov 1;188(9):1326-31. Epub 2003 Oct 28.
11. Tang J, Yam WC, Chen Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016 May;98:30-41.
12. Jeannette Guarner. Detection of Microorganisms in Granulomas That Have Been Formalin-Fixed: Review of the Literature Regarding Use of Molecular Methods. *Scientifica* Volume 2012.

13. Christopher R. Shaler, Carly N. Horvath, Mangalakumari Jeyanathan and Zhou Xing. Within the Enemy's Camp: contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Immunology Inflammation*. February 2013. Volume 4. Article 30
14. Jennifer A. Philips and Joel D. Ernst. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2012. 7:353–84
15. Sia JK, Georgieva M, Rengarajan J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. *J Immunol Res.* 2015;2015:747543.
16. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004;84(1-2):93-101
17. Delogu G, Provvedi R, Sali M, Manganeli R. *Mycobacterium tuberculosis* virulence: insights and impact on vaccine development. *Future Microbiol.* 2015;10(7):1177-94.
18. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr 20;12(5):352-66.
19. Silva Miranda M, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:139127.
20. Chan J, Mehta S, Bharrhan S, Chen Y, Achkar JM, Casadevall A, Flynn J. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Semin Immunol.* 2014 Dec;26(6):588-600. doi: 10.1016/j.smim.2014.10.005. Epub 2014 Oct 28.
21. Orme IM, Basaraba RJ. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Semin Immunol.* 2014 Dec;26(6):601-9.
22. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* 2011 May;4(3):271-8.



23. Tang YW, Procop GW, Zheng X, Myers JL, Roberts GD. Histologic parameters predictive of mycobacterial infection. *Am J Clin Pathol.* 1998 Mar;109(3):331-4.
24. Gupta M, Lobo FD, Adiga DS, Gupta A. A Histomorphological Pattern Analysis of Pulmonary Tuberculosis in Lung Autopsy and Surgically Resected Specimens. *Patholog Res Int.* 2016;2016:8132741.
25. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle.* 1970 Jun;51(2):196-206
26. Ritu Singhal, Vithal Prasad Myneedu. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology* 4 (2015) 1 – 6)
27. N.Selvakumar, V. Kumar, S. Sivagamasundari, P.R. Narayanan, Contamination of stored sputum AFB smears with environmental Mycobacterium, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10 (11) (2006) 1299–1301.
28. Rie, D. Fitzgerald, G. Kabuya, A. Van Deun, M. Tabala, N. Jarret, et al, Sputum smear microscopy, evaluation of impact of training, microscope distribution, and use of external quality assessment guidelines for resource-poor settings, *J. Clin. Microbiol.* 46 (3) (2008) 897–901.)
29. Singhal R, Myneedu VP. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriol.* 2015 Mar;4(1):1-6.
30. Ihama Y, Hokama A, Hibiya K, Kishimoto K, Nakamoto M, Hirata T, Kinjo N, Cash HL, Higa F, Tateyama M, Kinjo F, Fujita J. Diagnosis of intestinal tuberculosis using a monoclonal antibody to Mycobacterium tuberculosis. *World J Gastroenterol.* 2012 Dec 21;18(47):6974-80.
31. S. Sumi and V. V. Radhakrishnan. Evaluation of immunohistochemistry with a panel of antibodies against recombinant mycobacterial antigens for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* Vol 1.(5) pp. 215-219, May, 2009.



32. Karimi S, Shamaei M, Pourabdollah M, Sadr M<sup>4</sup>, Karbasi M, Kiani A, Bahadori M. Histopathological findings in immunohistological staining of the granulomatous tissue reaction associated with tuberculosis. *Tuberc Res Treat.* 2014;2014:858396.
33. Goel MM, Budhwar P. Immunohistochemical localization of mycobacterium tuberculosis complex antigen with antibody to 38 kDa antigen versus Ziehl Neelsen staining in tissue granulomas of extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Tuberc.* 2007 Jan;54(1):24-9.
34. Tadele A, Beyene D, Hussein J, Gemechu T, Birhanu A, Mustafa T, Tsegaye A, Aseffa A, Sviland L. Immunocytochemical detection of Mycobacterium Tuberculosis complex specific antigen, MPT64, improves diagnosis of tuberculous lymphadenitis and tuberculous pleuritis. *BMC Infect Dis.* 2014 Nov 25;14:585.
35. Kunnath-Velayudhan S<sup>1</sup>, Gennaro ML. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Oct;24(4):792-805.
36. Pedersen JS, Clarke I, Mills J. Improved detection of mycobacteria species in formalin fixed tissue sections. *Histopathology.* 2011 Nov;59(5):993-1005
37. Barbolini G, Bisetti A, Colizzi V, Damiani G, Migaldi M, Vismara D. Immunohistologic analysis of mycobacterial antigens by monoclonal antibodies in tuberculosis and mycobacteriosis. *Hum Pathol.* 1989 Nov;20(11):1078-83.
38. Che N, Qu Y, Zhang C, Zhang L, Zhang H. Double staining of bacilli and antigen Ag85B improves the accuracy of the pathological diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Pathol.* 2016 Jul;69(7):600-6.
39. Purohit MR, Mustafa T, Wiker HG, Mørkve O, Sviland L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis

- by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64. *Diagn Pathol.* 2007 Sep 25;2:36.
40. Mustafa T, Wiker HG, Mfinanga SG, Mørkve O, Sviland L. Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Mod Pathol.* 2006 Dec;19(12):1606-14. Epub 2006 Sep 15.
41. Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz L, Roth A, Brinkmann V, Kosmiadi GA, Seiler P, Aichele P, Hahn H, Krenn V, Göbel UB, Kaufmann SH. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative Mycobacterium tuberculosis organisms and their precise localization in human tissue. *J Pathol.* 2005 Apr;205(5):633-40
42. Kohli R, Punia RS, Kaushik R, Kundu R, Mohan H. Relative value of immunohistochemistry in detection of mycobacterial antigen in suspected cases of tuberculosis in tissue sections. *Indian J Pathol Microbiol.* 2014 Oct-Dec;57(4):574-8.
43. Seo KJ, Yoo CY, Im SY, Yeo CD, Jung JH, Choi HJ, Yoo JY. A possible complementary tool for diagnosing tuberculosis: a feasibility test of immunohistochemical markers. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Nov 1;8(11):13900-10.