

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

TITULO	Validez diagnóstica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para tuberculosis pleural		
SUBTITULO			
AUTOR(ES) Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Casallas Rivera, Martha Alejandra		
	Cárdenas Bernal, Ana María		
PALABRAS CLAVE (Mínimo 3 y máximo 6)	Biología molecular		tuberculosis
	derrame pleural		granulomas
	Mycobacterium tuberculosis		hiperplasia
RESUMEN DEL CONTENIDO (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>Introducción. Para el diagnóstico de tuberculosis pleural (TBP) el patrón de oro es invasivo y demorado.</p> <p>Métodos. Validez de la RT – PCR comparada con un patrón de oro compuesto. Incluimos pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario. Se consideró diagnóstico de TBP si el paciente tenía mínimo una de tres pruebas positiva: Ziehl-Neelsen o cultivo para MTb en líquido o tejido pleural o biopsia pleural; se descartó TBP si las tres pruebas eran negativas.</p> <p>Resultados. RT – PCR mostró una sensibilidad del 66,7%, una especificidad del 93,5%, un VPP de 75% y un VPN de 90,6%.</p> <p>Conclusiones. La RT - PCR para TBP no es un método diagnóstico definitivo, permite definir rápidamente el manejo, mientras llegan reportes de pruebas diagnósticas definitivas.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Hospital Universitario de la Samaritana E.S.E
Grupo de Inmunología Clínica Hospital de la Samaritana



Universidad de la Sabana



Facultad de Medicina
Área de investigación

VALIDEZ DIAGNÓSTICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL
PARA TUBERCULOSIS PLEURAL

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

VALIDEZ DIAGNÓSTICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL
PARA TUBERCULOSIS PLEURAL

AUTORAS:

Dra. Martha Alejandra Casallas Rivera
Dra. Ana María Cárdenas Bernal
Residentes de Medicina Interna
Universidad de la Sabana

COAUTORES:

Dr. Luis Fernando Giraldo
Asesor Metodológico y temático
Médico Internista. Neumólogo. Epidemiólogo. MD, FCCP.
Universidad de la Sabana. Clínica Universidad de la Sabana.

Dr. Enrique Prieto
Asesor Temático.
Médico Internista. Neumólogo
Hospital Universitario de la Samaritana (HUS)

Dra. Paola Santander
Bacterióloga, PhD
Coordinadora Laboratorio de Biología Molecular
Hospital Universitario de la Samaritana (HUS)

Los autores del presente trabajo certificamos que conocemos en su totalidad el contenido
y somos responsables de todo lo aquí escrito.

LISTA DE AUTORES

INVESTIGADORES:

Martha Alejandra Casallas Rivera

Ana María Cárdenas Bernal

Residentes de Medicina Interna, Universidad de la Sabana

COINVESTIGADORES:

Dr Luis Fernando Giraldo

Asesor Metodológico y temático

Médico Internista. Neumólogo. Epidemiólogo. MD, FCCP.

Universidad de la Sabana

Clínica Universidad de la Sabana

Dr. Enrique Prieto

Asesor Temático

Médico Internista. Neumólogo

Hospital Universitario de la Samaritana

Dra. Paola Santander

Bacterióloga. PhD.

Coordinadora Laboratorio de Biología Molecular

Hospital Universitario de la Samaritana

TABLA DE CONTENIDO

	PÁGINAS
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. EPIDEMIOLOGIA	10
2.2. FISIOPATOLOGÍA	10
2.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	12
2.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN TUBERCULOSIS	13
2.4.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL	16
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	4
5. MATERIALES Y METODOS	24
5.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
5.2. TIPO DE ESTUDIO	24
5.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO	25
5.4. REVISIÓN DE LA LITERATURA	26
5.5. RECOLECCIÓN DE DATOS	26
5.6. RESULTADOS	27
5.7. ANÁLISIS DERESULTADOS	28
6. DISCUSIÓN	30
7. CONCLUSIONES	33
8. ASPECTOS ÉTICO LEGALES	33
9. CONFLICTOS DE INTERES Y FINANCIACIÓN	34
10. CRONOGRAMA	35
11. PRESUPUESTO	36
12. ANEXOS	37
12.1. Prevalencia de Tuberculosis en el Hospital Universitario de la Samaritana del 1 de septiembre de 2009 al 31 de Diciembre de 2011	37
12.2. Instrumento de recolección de datos	38
12.3. Pruebas diagnósticas en líquido pleural tipo exudado y/o tejido pleural para diagnóstico de TBP. Año_____	39
12.4. Pacientes con PCR en tipo real positiva y patrón de oro combinado negativo. Seguimiento clínico a 6 meses.	40
12.5. Consentimiento informado	41
12.6. Flujograma de diagnóstico de TBP	43
13. BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE TRABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. DISEÑO DE LA MUESTRA	25
TABLA 2. RESULTADOS EN LAS DIFERENTES PRUEBAS DIAGNÓSTICAS CON RESPECTO AL DIAGNÓSTICO DE TBP SEGÚN EL DIAGNÓSTICO DEFINITIVO OBTENIDO POR EL PATRÓN DE ORO	28
FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO: RT-PCR EN LÍQUIDO PLEURAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TBP	29

RESUMEN

Introducción. Para el diagnóstico de tuberculosis pleural (TBP) el patrón de oro es invasivo y demorado, lo que dificulta el inicio oportuno del tratamiento.

La RT – PCR ha demostrado ser rápida para el diagnóstico de TBP, pero la evidencia para su validación en TBP aún es débil y las sensibilidades reportadas han sido subóptimas.

Métodos. Se evaluó la validez de la RT – PCR comparada con un patrón de oro compuesto mediante un estudio transversal en un hospital universitario de nivel III. Se incluyeron pacientes estudiados consecutivamente por derrame pleural tipo exudado linfocitario. Se consideró como patrón de oro para el diagnóstico de TBP si el paciente tenía al menos una de las siguientes tres pruebas positiva: ZN o cultivo para *Mtb* en líquido o tejido pleural o biopsia pleural con granulomas; se descartó TBP si las tres pruebas eran negativas. Se consideró como caso probable si el patrón de oro era negativo pero la RT- PCR positiva y el ADA mayor de 47UI/L. Finalmente se determinaron las características operativas de la RT- PCR, mediante la Prueba Mid-P Exact, con el Software OpenEpi 2.3 (2009).

Resultados. La RT – PCR mostró una sensibilidad del 66,7% (IC 95%: 33,2% - 90,7%) y una especificidad del 93,5% (IC 95%: 80,3% - 98,9%). La prevalencia de TBP en los exudados linfocitarios estudiados fue del 22.5%, con un VPP de 75% (IC 95%: 38,8% - 95,6%) y un VPN de 90,6% (IC 95%: 76,6% - 97,6%). Se encontraron 2 falsos positivos para la RT – PCR, uno con mesotelioma pleural y otro con pleuritis crónica con hiperplasia mesotelial.

Conclusiones. La RT - PCR para *Mtb* en líquido pleural no debería utilizarse como método diagnóstico definitivo sino para definir rápidamente el manejo, mientras llegan los reportes de las pruebas diagnósticas definitivas.

Palabras clave: Palabras clave: Biología molecular, derrame pleural, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, granulomas, hiperplasia, mesotelioma, diagnóstico, exudado y estudios de validación.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una infección conocida desde la antigüedad, producida por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Epidemiológicamente, la TB tiene distribución mundial, existiendo aproximadamente 16 millones de personas con TB activa(1). Es la segunda causa de muerte de etiología infecciosa en el mundo, y según la OMS, en la última década aparecieron de 8 a 10 millones de casos nuevos por año, de los cuales han muerto cerca de 3 millones de personas(2).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Colombia se registraron 11.424 casos nuevos en el 2009, de los cuales 7.597 fueron de tipo pulmonar con baciloscopia positiva incluyendo las recaídas, 1644 con tuberculosis sin resultado en la baciloscopia o resultado negativo y los 2.183 restantes extrapulmonares. La incidencia de TB en el país es de 25 casos de TB por cada 100.000 habitantes. La población en la cual se presentan más casos se encuentra en las edades entre los 25 y 34 años. Sin embargo, la tasa más alta es en personas mayores de 65 años, siendo los hombres los más afectados, en todos los grupos de edad (razón 1,5:1), aunque la diferencia se acentúa a mayor edad(3).

Aunque la mayoría de los pacientes con esta entidad tienen TB pulmonar, el compromiso extrapulmonar afecta en orden de frecuencia en primer lugar los ganglios linfáticos y en segundo lugar la pleura, siendo estas la manifestación inicial en el 25% de los adultos(1, 4)

La TB es la causa más frecuente de derrames pleurales en muchos países, por tal motivo es importante considerar la posibilidad de tuberculosis pleural en todos los pacientes con un derrame pleural no diagnosticado(5). El derrame pleural como manifestación aislada de TB es usualmente autolimitada, con clínica no específica y naturaleza paucibacilar, pero puede llevar a enfermedad seria muchos años después(1).

Dada la naturaleza de la infección, particularmente la forma pleural, la baja sensibilidad de métodos de laboratorio convencional y la necesidad de realizar biopsia pleural han motivado la evaluación de estrategias diagnósticas alternativas, para conseguir un diagnóstico rápido, no invasivo y certero, elemento importante para el tratamiento de la enfermedad. Los métodos tradicionales de diagnóstico de la enfermedad son la sintomatología clínica acompañada de radiografía de tórax y del diagnóstico microbiológico, donde la recolección de la muestra representa un paso clave fundamental en el resultado de estas pruebas (1), ya que no existe una prueba rápida y puntual que permita hacer el diagnóstico temprano de la tuberculosis activa(6, 7).

El estándar de oro para el diagnóstico de la TB es la combinación de la identificación del bacilo por microscopía con la identificación del subtipo y su resistencia a antibióticos mediante cultivo(5). El *Mycobacterium tuberculosis* se aísla en cultivo solo en un 20 a 40% de los casos de una pleuritis tuberculosa confirmada, siendo el rendimiento diagnóstico del cultivo en líquido pleural bajo, pero puede aumentar si también se cultiva una muestra de tejido pleural(5, 8). Adicionalmente se ha recomendado utilizar otras pruebas en asociación con el cultivo como la tinción de Ziehl – Neelsen (ZN), pero esta rara vez es positiva (< 5% de los casos) debido a la naturaleza paucibacilar de la tuberculosis pleural (TBP)(5, 8).

Sin embargo, el lento crecimiento del *Mycobacterium tuberculosis* ha llevado a la búsqueda de pruebas rápidas de diagnóstico y de nuevos métodos que lo detectan directamente en muestras clínicas, sin la necesidad de hacer cultivos(1).

Aunque el derrame pleural por TB podría resolverse en varios meses sin tratamiento, una falla en el diagnóstico y el manejo de la TBP puede resultar en enfermedad progresiva e involucrar a otros órganos en casi el 65% de los pacientes. Sin embargo, el tratamiento basado en la sospecha clínica y no en los resultados de diagnóstico microbiológico resulta en sobret ratamiento, retraso en el diagnóstico exacto y mayor morbilidad(4).

En los últimos años, se ha investigado la utilidad de diversos parámetros bioquímicos en el diagnóstico de los derrames pleurales tuberculosos (DPTB), donde el Adenosin Deaminasa (ADA) y el Interferón (INF γ) han demostrado utilidad clínica, sin embargo, no hay un nivel de corte aceptado universalmente, ya que cada centro debe establecer el suyo propio según su casuística y los métodos de determinación utilizados(9). El ADA ha mostrado tener una alta sensibilidad, excepto en pacientes VIH positivos, y una variable especificidad, para el diagnóstico de TBP(10). El INF γ ha mostrado tener buena sensibilidad y especificidad en TBP, además de ser igualmente útil en paciente con o sin VIH (11)

La amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) facilita el diagnóstico de TBP al permitirnos obtener el resultado el mismo día, tiene una sensibilidad intermedia entre el cultivo y el ZN, y adicionalmente identifica el *Mycobacterium* del complejo *tuberculosis*. Entre las desventajas de este método esta que requiere de técnicas de laboratorio especializadas, no diferencia entre microorganismos viables o no viables; y aún se requiere del cultivo para la tipificación de la bacteria y las pruebas de sensibilidad. La alta especificidad biológica de la PCR para *M. tuberculosis* sugiere que este método, cuando se usa en combinación con la medida de actividad de ADA o niveles de INF γ , podría mejorar la eficiencia del diagnóstico bacteriológico del DPTB (4). La especificidad varía entre el 93-99% y la sensibilidad oscila entre 37 y 80% dependiendo el tipo de PCR utilizada, siendo la sensibilidad aún baja para poderla recomendar como patrón de oro en el diagnóstico de TBP (9). Es por esto que para que pueda ser utilizada ampliamente en el diagnóstico de la TBP, es necesario evaluar estos aspectos y comparar los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (en inglés real time: RT – PCR) sondas de hibridación con los de métodos tradicionales de diagnóstico (patrón de oro) en nuestra institución, para lo cual hemos realizado el presente estudio.

2. MARCO TEORICO

2.1. EPIDEMIOLOGIA

Según lo reportado por el Instituto Nacional de Salud correspondiente al acumulado hasta la semana epidemiológica 36 del año 2012, se han reportado 8446 casos de tuberculosis, el 73,4% ingresaron como confirmados por laboratorio. En la semana epidemiológica 30 del 2012 de 7194 casos, el 24,1% fueron confirmados por clínica y el 1,3% restante ingresaron confirmados por nexa epidemiológico. En cuanto al tipo de tuberculosis, siguiendo el comportamiento regular para el evento, el 79.6% de los casos corresponde al tipo pulmonar, y durante la semana epidemiológica 30 del 2012 el 17,7% de los casos correspondieron al tipo extrapulmonar y el 2,6% restante al tipo meningitis tuberculosa. El 51,9% de los casos los notificaron los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca y los distritos de Bogotá y Barranquilla(12).

El más reciente reporte global de TB (2010) mostró que 9.4 millones de casos nuevos de TB fueron reportados en 2009, y de estos 1.7 millones de personas murieron por dicha causa.(13)

La frecuencia de TB como causa de derrame pleural varía. En Estados Unidos, según lo reportado por Richard W. Light, se encontraron solo 3000 casos de derrame pleural por TB, representando así la décima causa de derrame pleural (14). En contraste, en los países en vía de desarrollo donde la TB es endémica, la TB es la causa más frecuente de derrame pleural (15).

2.2. FISIOPATOLOGÍA:

El derrame pleural tuberculoso puede corresponder a una infección primaria, postprimaria ó a una reactivación. Un derrame pleural tuberculoso que se presenta en ausencia de

hallazgos radiológicos aparentes de TB puede ser secuela de una infección primaria que se presentó 6 a 12 semanas antes, o puede representar una reactivación de la infección (5, 16).

La TBP se inicia con la ruptura de un foco caseoso subpleural del pulmón en el espacio pleural que puede incluir bacilos viables o no viables. Después de la ruptura del foco caseoso, los antígenos de las micobacterias que entran en el espacio pleural interactúan con los linfocitos T-CD4, lo que resulta en una reacción inmunogénica de hipersensibilidad retardada(5, 17). El derrame pleural tuberculoso se produce cuando la reacción de hipersensibilidad produce un aumento de la permeabilidad de los capilares pleurales a las proteínas lo que aumenta los niveles de proteínas en el líquido pleural y esto genera una mayor tasa de producción de líquido pleural. Adicionalmente la pleuritis linfocítica produce obstrucción de los linfáticos en la pleura parietal, y esto conlleva a una menor depuración del líquido desde el espacio pleural. Por lo tanto, la acumulación de líquido en el espacio pleural se produce por un aumento en la producción de líquido y una disminución en su remoción(18). También se ha descrito que el derrame pleural tuberculoso puede ser secundario a una diseminación linfática o hematogena.

Las células involucradas son los neutrófilos, monocitos, macrófagos e INF γ , produciendo activación de los linfocitos Th1, siendo estos los efectores de la respuesta inmune protectora, y han sido las células más extensamente investigadas en términos de expresión de receptores TRC antígeno específicos, marcadores funcionales y producción de citoquinas asociado con el control de la infección (infección latente) vs pérdida del control inmune (TB activa)(7). Las siguientes quimiocinas: Interleucina (IL)-8, péptido activador de neutrófilos-2 (NAP-2), proteína inflamatoria de macrófagos-1 (MIP-1), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), factor de necrosis tumoral α (TNF α) y las IL 1, 6 y 12 están involucradas en el proceso inmunológico. (5)

La reacción de hipersensibilidad está mediada por los linfocitos Th1 para contener al *M. tuberculosis*, sin embargo los efectos protectores de esta respuesta son antagonizados por la actividad de los linfocitos Th2, principalmente por la IL-4 que estos liberan. La predominancia en la respuesta Th1 en la TBP se demuestra por los niveles marcadamente elevados del INF γ en el líquido pleural comparado con la sangre periférica del mismo paciente (5, 19).

2.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La TBP se manifiesta como una enfermedad aguda, con aproximadamente un tercio de los pacientes sintomáticos por menos de una semana y dos tercios de los pacientes por menos de un mes (17). Los síntomas más comunes son dolor pleurítico (75%), y tos no productiva (70%). La TBP es más frecuente en los pacientes jóvenes, con una edad media de presentación de 28 años, mientras que la TB pulmonar es más frecuente en los mayores de 54 años (20). Sin embargo, se ha demostrado un aumento en la edad de presentación de la TBP en los mayores de 56 años, en un 19%, como consecuencia de una reactivación de la infección. Por lo tanto, se debe sospechar TB en todo paciente adulto o anciano con un derrame pleural unilateral(2).

En la mayoría de los pacientes la enfermedad se caracteriza por el inicio subagudo de fiebre, tos, dolor pleurítico, disnea. En series representativas, la fiebre de alto grado (86%), dolor torácico (75%) y tos (70%) fueron los síntomas más frecuentes, seguidos de una serie de manifestaciones inespecíficas como anorexia, pérdida de peso, malestar, debilidad generalizada, fatiga y diaforesis nocturna. El 7% de los pacientes de este estudio cursaron con enfermedad severa definida como fiebre de alto grado persistente mayor de 38.3°C por más de 2 semanas (21).

Los derrames pleurales tuberculosos típicamente son pequeños y ocupan menos de 2/3 del hemitorax comprometido. Los pacientes VIH positivos con TBP suelen ser de mayor

edad, y son más frecuentemente positivos para el ZN, el cultivo y la biopsia, además de mostrar mayor incidencia de enfermedad diseminada(21).

2.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN TUBERCULOSIS:

Se han desarrollado una amplia gama de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis activa. Ninguna prueba sola es perfecta, y desafortunadamente, muchos clínicos confían en métodos que fueron desarrollados hace incluso 100 años (4, 12, 22).

El examen directo del líquido pleural y la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) requieren concentraciones bacilares de 10^3 a 10^5 microorganismos/mL (4, 12, 22) y a pesar de ello tienen una baja sensibilidad (0-1%), no puede diferenciar entre el *M. tuberculosis* y otras especies de micobacterias; sin embargo tiene la ventaja que es una prueba simple y económica que nos permite tener los resultados el mismo día y su montaje puede ser realizado en laboratorios de baja complejidad (4, 12, 22).

El cultivo en un medio sólido (Lowenstein-Jensen u Ogawa-Kudoh en huevo ó Middle-Brook en agar) es el estándar de oro para el aislamiento del *M. tuberculosis* con una sensibilidad del 11 a 50%, detecta de 10 a 100 microorganismos/mL, permite la tipificación y sensibilidad a medicamentos; sin embargo su principal limitación es que toma de tres a ocho semanas el resultado (23)

La escasez de bacilos y las características citoquímicas del líquido pleural no específicas de TBP obligan a realizar procedimientos más invasivos tales como biopsia pleural o toracotomía para el diagnóstico diferencial(4).

Una biopsia de la pleura con la recolección de 3 ó 4 muestras para el estudio histológico, tinción de ZN y cultivo del tejido pleural, confirma el diagnóstico en un 65 a 75% de los pacientes a los que se les ha hecho diagnóstico de TBP (8). La sensibilidad de la biopsia

pleural es superior ya sea por cultivo (39-79%) o por hallazgos histológicos (71-80%), sin embargo este procedimiento requiere mayor experiencia, es más invasivo y está sujeto a errores en la toma de las muestras(4). Un segundo set de muestras en los pacientes en que inicialmente salió la biopsia negativa aumenta el rendimiento diagnóstico a un 80 a 90%(8). La combinación de biopsia pleural para estudio histológico y cultivo de líquido o tejido es actualmente el método diagnóstico más sensible(24).

Los resultados de la toracoscopia casi siempre son diagnósticos pero este es un procedimiento invasivo, costoso y no siempre está disponible(8).

En el caso usual de una pleuresía postprimaria con derrame, el ZN del sedimento del líquido es rara vez positiva, el cultivo es positivo en 25 a 30 % de los casos, la biopsia con evidencia de granulomas es positiva en un 75% , y el cultivo de la biopsia es positivo hasta en un 25% de los casos con pleuritis inespecífica en la histología(23). En los casos en que el derrame está complicando una tuberculosis pulmonar crónica es más frecuente que el ZN del líquido pleural sea positivo en un 50% de los casos y que los cultivos sean positivos en un 60% pero es menos frecuente que la biopsia pleural demuestre granulomas (25% de los casos), y es en estos pacientes en los que se debe repetir la biopsia para establecer el diagnóstico (23).

La Adenosin deaminasa (ADA) marcador inflamatorio no específico, es una enzima cuya actividad está involucrada en la diferenciación y proliferación de los linfocitos y la activación de los macrófagos y neutrófilos, siendo indicativa de respuesta inflamatoria local activa (4, 5). La determinación de la isoenzima ADA2 podría aumentar la precisión ya que es liberada de los monocitos y es encontrada en una alta concentración en pleuritis por TB. Varios estudios han sugerido que niveles mayores de ADA en líquido pleural predicen mejor el diagnóstico de TB con una sensibilidad del 90 al 100% y una especificidad del 89 al 100% cuando se usa el método Guisti. La especificidad para

discriminar entre derrame pleural por TB y malignidad fue del 95%, siendo baja para la diferenciación entre derrame paraneumónico (5).

El INF γ es una linfocina liberada por los linfocitos CD4+ sensibilizados, que aumenta la actividad micobactericida de los macrófagos. Numerosos estudios han demostrado su utilidad en el diagnóstico de los DPTB. En un meta-análisis reciente, su máxima sensibilidad y especificidad conjuntas fue del 96% (9).

Individualmente, el ADA y el INF γ han mostrado ser sensibles y específicos para TBP en poblaciones con una alta prevalencia de TB; sin embargo la evaluación indirecta de la actividad del ADA, la limitada información acerca del INF γ en líquido pleural y el riesgo de falsos positivos en poblaciones con baja prevalencia de TB han limitado el uso rutinario de estas pruebas(4). Se debe tener en cuenta la alta rentabilidad del ADA y el mayor coste del INF- γ , así como la experiencia de cada laboratorio, para la selección de estos parámetros en la práctica clínica (9).

La PCR se basa en la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) de la micobacteria, sus resultados dependen de la técnica utilizada, así como del número de bacilos en la muestra de líquido analizada, siendo positiva en el 100% de los DPTB con cultivo positivo y en el 30-60% de los líquidos con cultivo negativo(9). Comercialmente se cuenta con pruebas artesanales y comerciales, de las cuales, las pruebas llamadas artesanales, producen resultados altamente inconsistentes comparado con las comerciales, que están estandarizadas(6) y en las que se ha encontrado una alta especificidad (98%) pero con una baja o variable sensibilidad (62%), no siendo útil para excluir la enfermedad(5).

Existen 2 grandes obstáculos al éxito de la técnica: la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción del ADN; y la presencia de inhibidores de la PCR. La manipulación necesaria para la extracción del ADN condiciona la posibilidad de contaminación cruzada, adicionalmente se utilizan reactivos y procedimientos agresivos que podrían producir pérdida del genoma micobacteriano presente en la muestra y por

otra parte existe la variabilidad biológica y la amplificación inespecífica lo que podría alterar la especificidad y sensibilidad de la técnica. Esta prueba es particularmente útil en infecciones no bacilíferas y en pacientes con cuadros atípicos asociados con VIH o a la inmunosupresión por trasplante(25).

El rendimiento de la prueba dependerá de la probabilidad pretest. Sin embargo, hasta el 2008 ningún kit comercial ha sido aprobado por los Estados Unidos en la Food and Drug Administration para el diagnóstico de la TB extrapulmonar, por ende la PCR no puede ser utilizada de forma aislada para descartar o confirmar TBP (5).

2.4.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (en inglés real time: RT – PCR):

La RT – PCR es una técnica donde los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial. Los termocicladores para llevar a cabo la RT - PCR incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación. Mediante la detección de la fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la RT – PCR pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos(26).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en RT – PCR es el SYBR Green I (26). La optimización de las condiciones de la reacción es fácil y es económico. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la

especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*hot-start PCR*) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana (26).

Las sondas de hibridación específicas, son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son (26):

1. Sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan. Son secuencias de oligonucleótidos: dos primers y dos pruebas, marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un fluorocromo aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. La secuencia de las dos pruebas es seleccionada de manera que puedan hibridarse con la secuencia objetivo de una forma cabeza a cola (27). Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (26). La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN objetivo generado durante el proceso de PCR(27). Estas pruebas de hibridación han sido utilizadas para diferenciar el complejo *M. tuberculosis*, *M. avium* y otras micobacterias no tuberculosas(27).

2. Molecular beacons. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro, sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero(26).

3. Sondas FRET. El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo(26).

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil (26).

La RT-PCR se ha convertido en un método ampliamente utilizado para la determinación tanto cuantitativa como cualitativa de los objetivos moleculares. El poder de la RT – PCR está en que la respuesta de la fluorescencia observada es una medida directa de la dinámica de la reacción del proceso de amplificación(28).

La RT – PCR se compara muy favorablemente con el cultivo para la detección directa de las micobacterias, en especial *M. tuberculosis*, *avium* y *bovis*. La combinación de la RT – PCR con secuencias específicas de pruebas fluorogénicas tiene el potencial de optimizar la

detección del ADN o ARN de la micobacteria en esputo, lavado broncoalveolar, LCR, líquido pleural y muestras tisulares(27).

La prueba diagnóstica evaluada en el presente trabajo es *MTB Real – TM* (Equipo de RT – PCR para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*) la cual es un test de amplificación en tiempo real para la detección cualitativa del complejo *M. tuberculosis* en materiales biológicos. El ADN es extraído de las muestras, amplificado y detectado mediante sondas fluorescentes específicas para *M. tuberculosis* y *M. tuberculosis* (control interno). *M. tuberculosis* (control interno) es un fragmento de ADN de inserción IS 6110 de *M. tuberculosis* modificado y clonado en el bacteriófago λ , conteniendo fragmentos de ADN usados en el equipo como matriz para el primer.

3. JUSTIFICACION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa que actualmente representa un grave problema de salud pública en Colombia. A pesar de los múltiples esfuerzos de los últimos años, la TB continúa siendo una causa importante de mortalidad en el mundo y un reto para todos los países en términos de salud pública.

Dada la naturaleza de la infección, particularmente la forma pulmonar, un diagnóstico rápido y certero es un elemento importante para curar y controlar la enfermedad. Los patrones de enfermedad han ido cambiando, con una mayor incidencia de enfermedad diseminada y compromiso extrapulmonar, dentro de los cuales está la forma pleural.

Un diagnóstico oportuno permite disminuir las secuelas de la infección y el inicio temprano de la terapia antituberculosa puede disminuir la morbimortalidad, y la propagación de la infección en la población.

Se debe tener presente que una coloración para bacilos ácido-alcohol resistentes negativa, la ausencia de granulomas en la histopatología, y la negatividad en el cultivo del *Mycobacterium tuberculosis* no excluye el diagnóstico, ya que el cultivo requiere más de 10 bacilos/mL para ser positivo. Adicionalmente, a pesar de ser la prueba patrón de oro para el diagnóstico, esta tarda entre 3 y 8 semanas para el aislamiento del microorganismo, lo cual retrasa el diagnóstico e inicio de tratamiento tempranos. Es por esto que se han desarrollado nuevas modalidades diagnósticas como la determinación de PCR, que permitan una aproximación diagnóstica más rápida para la implementación oportuna del tratamiento, evitando exponer al paciente a los efectos secundarios de los mismos, sin tener una confirmación diagnóstica.

La PCR puede realizarse en tan solo 24 a 48 horas y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha

clínica de tuberculosis y resultados negativos en la tinción de Ziehl-Neelsen o el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones paucibacilares como es el caso de la TBP y en pacientes con cuadros atípicos asociados con inmunodeficiencias.

Existen diversos estudios de PCR para el diagnóstico de TBP alrededor del mundo, en los cuales se han utilizado PCR artesanales y comerciales, con el uso de diferentes Kit que hacen que los resultados no sean completamente homogéneos. En un metaanálisis publicado por Pai M, Flores LL, et al en el BMC of Infectious Diseases en el año 2004, en el cual se reportan especificidades entre el 93% y el 98%, sin embargo bajas sensibilidades que van desde el 37% al 77%(29). En otro estudio publicado en el Journal of Clinical Microbiology de septiembre de 2005 por Soumitesh Chakravorty S, Manas Kamal Sen, and Jaya Sivaswami Tyagi, encontraron sensibilidades hasta del 75% con una especificidad superior al 93%(30). En Taiwan, los investigadores Kuan-Ting Liu, Wei-Juin Su y Reury-Perng Taipei en Julio de 2007 se reportó una sensibilidad del 43% con una especificidad del 95.5%(31). Por último en el año 2011 se publicó un estudio por Yatiraj Kalantri Y, Hemvani N. en el International Journal of Infectious Diseases donde compararon el INF γ , ADA, IgA y la RT – PCR con un patrón de oro combinado, encontrando una sensibilidad del 80% con una especificidad del 98% (32).

Para el uso de una prueba como estándar de oro para diagnóstico, ésta debe estar previamente validada y debe tener características operativas estadísticamente aceptadas por lo que su sensibilidad y especificidad deben ser idealmente superiores al 80%. Es por esto que el objetivo principal del presente trabajo es establecer las características operativas de la RT –PCR sondas de hibridación para el diagnóstico de tuberculosis pleural. Para esto se comparó dicha prueba con un estándar de oro combinado que incluyó cultivo, histopatología y la coloración de ZN del líquido y/o tejido pleural(5).

Con lo anterior se estaría contribuyendo con la incorporación de un método diagnóstico que evite someter a los pacientes al riesgo de una biopsia pleural, obteniendo resultados en un menor tiempo y con un peso estadísticamente significativo que le permita al clínico, en pacientes con sospecha de TBP, el diagnóstico rápido y el inicio oportuno del

tratamiento con plena confianza en el método utilizado, reduciendo su morbimortalidad y estancia hospitalaria y tornándose en una prueba costo-efectiva con impacto en salud pública por ser esta una entidad infectocontagiosa de alta prevalencia en nuestro país.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer las características operativas de la RT –PCR sondas de hibridación, para el diagnóstico de tuberculosis pleural en pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la sensibilidad y especificidad de la RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural para diagnóstico de TBP.
2. Precisar el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural para diagnóstico de TBP.
3. Fijar los falsos positivos y negativos de la RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural para diagnóstico de TBP.
4. Comparar la sensibilidad y especificidad de cultivo de *M. tuberculosis* y PCR en líquido pleural para diagnóstico de TBP.
5. Comparar la sensibilidad y especificidad del Ziehl- Neelsen y PCR en líquido pleural para diagnóstico de TBP.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las características operativas de la RT –PCR sondas de hibridación para el diagnóstico de TBP en pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario?

5.2. TIPO DE ESTUDIO

Estudio de validación de pruebas diagnósticas de corte transversal para determinar la probabilidad de que pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario cursen con TBP al tener una RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural positiva para *Mycobacterium tuberculosis* comparando dicho resultado con el patrón de oro y de esta forma poder definir las características operativas de la RT –PCR sondas de hibridación para el diagnóstico de TBP.

Para esto se estableció la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y LR para esta prueba diagnóstica, y se tomó un estándar de oro combinado fijado de la siguiente forma:

- Cultivo de líquido o tejido pleural para *M. tuberculosis*
- Ziehl-Neelsen de líquido o tejido pleural
- Histología de tejido pleural con granulomas

Con la presencia de una de estas tres pruebas diagnósticas positiva se confirma la enfermedad por *M. tuberculosis* y dicha entidad se descarta si los tres son negativos.

A los pacientes que cursaron con RT –PCR sondas de hibridación en líquido o tejido pleural positiva y el estándar de oro negativo se les realizó seguimiento clínico vía telefónica y/o presencial, para determinar su evolución en un periodo de tiempo de 6 meses.

5.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Todos los pacientes estudiados por derrame pleural tipo exudado linfocitario durante el periodo comprendido entre el 1 de septiembre de 2009 hasta el 1 de octubre de 2012 cuando se completó el tamaño de muestra calculado para alcanzar los objetivos del estudio.

5.3.1. Muestra:

- Pacientes en estudio de derrame pleural tipo exudado linfocitario
- Tamaño de la muestra:

Para obtener una sensibilidad del 90% y una especificidad del 95% para RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural, donde el 50% de los pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario tienen diagnóstico de TBP y se estimó un ancho del intervalo de confianza (IC) del 95% en 0.1, se necesitó una muestra de 34 pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario (33, 34).

DISEÑO A UNA MUESTRA (two-sided test: $Z_{0,95}=1,96$)

Confianza en %: (1-error alfa)*100	95%	1,96
Potencia en % (1-error beta)*100	80%	0,84
Sensibilidad conocida (Se_{Known})	0,60	
Sensibilidad planeada (Se_{plan})	0,90	
Prevalencia de la enfermedad ($\pi_{Disease}$)	0,50	
N (enfermos: $N_{Disease}$)	16,34	
N (enfermos: $N_{Disease}$) REDONDEADO	17,00	
N	34,00	
N (redondeado)	34	n=

Tabla 1. Diseño de la muestra

5.3.2. Criterios de inclusión:

- Pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario

- Pacientes con estudio de líquido pleural que incluya una de las siguientes pruebas positiva o las tres negativas: ZN de líquido o tejido pleural, cultivo de líquido o tejido pleural para *M. tuberculosis* y/o histología de tejido pleural con granulomas
- RT –PCR sondas de hibridación de líquido pleural para estudio de *M. tuberculosis*
- Técnica de procesamiento igual para cada una de las pruebas.

5.4. REVISIÓN DE LA LITERATURA

La revisión de la literatura, para la estructuralización del presente trabajo se realizó de textos básicos como Principles and practice of infectious diseases. 6th. ed. Mandell, Bennett & Dolin; Pleural Diseases. 5th. Ed. Richard W. Light y el libro de microbiología y parasitología de Murray. Adicionalmente la búsqueda actualizada de literatura se realizó mediante buscadores especializados como PubMed, Ovid y MDconsult buscando un estado del arte actualizado y de profundidad científica.

5.5. RECOLECCIÓN DE DATOS

Nos dirigimos al departamento de Infectología con el fin de determinar el número de casos de infección por *M. tuberculosis* en el HUS y de ella cuanto corresponde a TBP para establecer el tamaño de la muestra (Ver Anexo 1.).

Posteriormente realizamos una investigación exhaustiva en los registros del laboratorio de biología molecular para establecer cuántos estudios de líquido y tejido pleural contaban con RT –PCR sondas de hibridación durante el periodo de la investigación. De dichos líquidos se verificó en microbiología las características citoquímicas y cuáles de estas muestras tenían cultivo para *M. tuberculosis* y ZN. Finalmente indagamos en el departamento de patología acerca de las muestras de tejido pleural que contaban con ZN, cultivo para *M. tuberculsis* y estudio histológico de pleura. (Ver Anexo 2 y 3.).

Posteriormente se revisaron las historias clínicas de los pacientes con el fin de establecer características clínicas que se asociaran con el diagnóstico bacteriológico o histológico de TBP y las conductas de tratamiento a los que fueron sometidos, se buscaron los números telefónicos y/o notas de control médico de todos los pacientes que tuvieron RT –PCR sondas de hibridación positiva con el patrón de oro combinado negativo y se realizó un seguimiento a 6 meses para evaluar la evolución clínica de dichos pacientes (Ver Anexo 4.).

Una vez recolectada la información, nos dispusimos a realizar su respectiva codificación y tabulación por doble entrada, para esto se utilizó un instrumento diseñado para la recolección de datos que facilitó su tabulación y posterior análisis (Ver Anexo 2.).

5.6. RESULTADOS

Se realizaron tablas de contingencia comparando la PCR con el patrón de oro para determinar su sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos y valores predictivos. Para lo anterior la información se introdujo en bases de datos por doble entrada y luego se confrontaron para valorar errores en la digitación y corregirlos. Finalmente el análisis de los datos se realizó mediante la utilización del software SPSS versión 15.

Tabla 2. Resultados en las diferentes pruebas diagnósticas con respecto al diagnóstico de TBP según el diagnóstico definitivo obtenido por el patrón de oro.

Diagnóstico Definitivo	N	RT – PCR en líquido		ZN líquido		ZN tejido		Cultivo MTb líquido		Cultivo MTb tejido		Histología pleura de TBP	
		Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
TBP	9	6	3	2	3	-	2	5	2	1	-	5	-
Mesotelioma	5	1	4	-	5	-	-	-	5	-	-	-	5
Pleuritis crónica con hiperplasia mesotelial	2	1	1	-	2	-	1	-	2	-	-	-	2
Otros Tumores	5	-	5	-	5	-	-	-	5	-	-	-	5
Pleuritis inespecífica	19	-	19	-	17	-	2	-	18	-	1	-	19

Nota: TBP: tuberculosis pleural; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; ZN: coloración de Ziehl Neelsen; *MTb*: *Mycobacterium tuberculosis*.

5.7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Participantes y resultados:

Se obtuvo una población de 60 pacientes en estudio de derrame pleural en el HUS durante el periodo del estudio, de los cuales 40 cumplieron con los criterios de inclusión y de estos a nueve (prevalencia de 22,5%) se les confirmó el diagnóstico de TBP con el patrón de oro. De estos nueve pacientes confirmados con TBP, 6 fueron positivos y 3 negativos para la RT – PCR. No hubo pacientes con TBP probable. Se presentaron 2 falsos positivos para la RT – PCR, uno con un mesotelioma pleural y el otro con una pleuritis crónica con hiperplasia mesotelial (ver Figura 1.). En los pacientes con diagnóstico de TBP encontramos una media de 47,4 años de edad con una desviación estándar de $\pm 15,20$. El 66,7% de los pacientes con TBP fueron hombres y el 33,3% restante fueron mujeres.

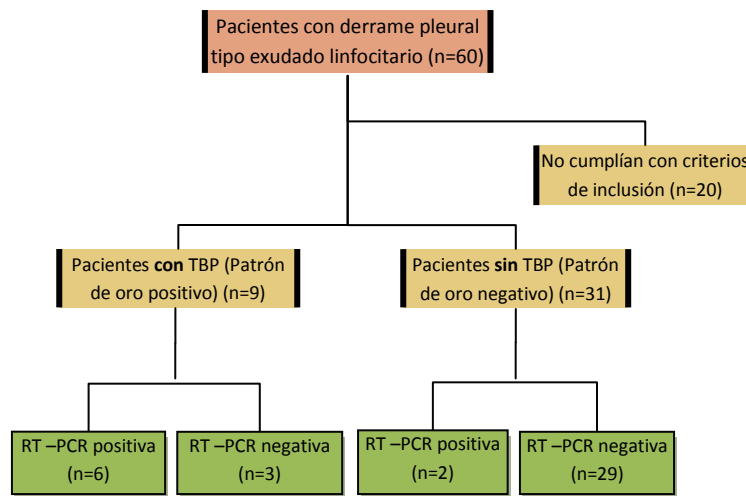


Figura 1. Diagrama de flujo: RT – PCR en líquido pleural para diagnóstico de TBP.

Nota: TBP: tuberculosis pleural; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Estimaciones: Para la prueba en estudio (RT – PCR cualitativa para *MTb*) se calculó una sensibilidad del 66,7% (IC 95%: 33,2% - 90,7%) y una especificidad del 93,5% (IC 95%: 80,3% - 98,9%). El VPP fue 75% (IC 95%: 38,8% - 95,6%) y el VPN fue 90,6% (IC 95%: 76,6% - 97,6%) (ver Tabla 1).

Con respecto al cultivo para *MTb* en líquido pleural se encontró una sensibilidad del 55,6% (IC 95%: 39,7% - 89,2%) con una especificidad del 100% (IC 95%: 87,1 – 100%); y para el ZN en líquido pleural se calculó una sensibilidad del 22,2% (IC 95%: 39,7% - 89,2%) con una especificidad del 100% (IC 95%: 87,1% - 100%) (ver Tabla 1).

6. DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos y analizados por el método descrito se establecieron las características operativas de la RT –PCR para el diagnóstico de *MTb* en líquido pleural en el HUS. Se determinó una sensibilidad (66,7%) similar a lo encontrado en estudios previamente referenciados (29-32). Por otra parte, la especificidad calculada fue relativamente alta (93,5%) y ambos resultados fueron similares a lo encontrado por otros autores.

Con respecto al cultivo para *MTb* en líquido pleural se encontró una sensibilidad del 55,6% mientras que para el ZN en líquido pleural fue del 22,2%, ambos tuvieron una especificidad del 100%. Estos valores muestran sensibilidades menores a la de la RT – PCR, confirmando una vez más la necesidad de tener un patrón de oro combinado ya que estas pruebas por si solas no podrían descartar la presencia de tuberculosis pleural. Adicionalmente, en el caso de los cultivos, el tiempo necesario para obtener el diagnóstico se alarga de tal manera que obliga a recurrir a una prueba rápida, como la RT – PCR, para definir el manejo inicial del paciente.

En el meta-análisis publicado en el año 2004 por Pai M, et al. (29), se evaluó PCR comerciales y artesanales, reportando una sensibilidad del 62% y 71%, con una especificidad del 98% y 93%, respectivamente, lo cual es similar a lo encontrado en nuestra investigación para RT – PCR. Los estudios incluidos en este meta-análisis tenían tamaños muestrales pequeños y eran heterogéneos, los patrones de oro utilizados incluían cultivo para *MTb*, hallazgos clínicos, microbiología o biopsia, de tal forma que estos patrones de oro carecen de precisión para dar un diagnóstico definitivo y dificultan la validación de la prueba en estudio. Posteriormente en el año 2005, Chakravorty S, et al. (30), utilizaron el ensayo IS6110 y devRf3 (pruebas artesanales) en líquido con una sensibilidad del 75,5% y una especificidad del 93,8%, similar para cada prueba, con una mayor sensibilidad a la reportada por nosotros e igual especificidad, con un patrón de oro

compuesto, no bien definido, dado por la clínica, microbiología, cito/histología y la respuesta a tratamiento, con una muestra de 87 pacientes. En el año 2007 en Taiwán, Liu K, et al.(31), publicaron un estudio de PCR artesanal utilizando el segmento IS6110, reportando una sensibilidad del 43,3% y una especificidad del 95,5%, siendo la sensibilidad inferior a la descrita en nuestra investigación, sin variaciones en la especificidad y con falsos positivos en un 4,5% de los pacientes estudiados. Adicionalmente en el patrón de oro combinado se incluyó la clínica y la respuesta al tratamiento empírico lo que dificulta realizar una evaluación objetiva. Y finalmente en el año 2011 Kalantri Y, et al. (32), con una población de 204 casos divididos en 3 grupos por su forma de diagnóstico (confirmada, probable y sin TBP) reportó una sensibilidad del 80% al tener un patrón de oro compuesto igual al usado por nosotros y del 57,7% al tener en cuenta la clínica, respuesta al tratamiento y haber excluido otras patologías, con una especificidad del 98% similar a la descrita en el presente trabajo.

Según lo encontrado en la literatura y lo analizado en este estudio, las características operativas de la PCR varían dependiendo de la técnica utilizada y de la asociación de otras pruebas diagnósticas y características clínicas del paciente. Se puede observar que el uso de la RT – PCR arroja resultados en menor tiempo, con alta especificidad pero una baja sensibilidad. Esto hace que la prueba resulte insuficiente para descartar TBP si la RT – PCR es negativa y no existe otro diagnóstico alternativo, y exige realizar el patrón de oro combinado completo. Al tener unos valores de sensibilidad y especificidad superiores a los obtenidos con las otras pruebas en forma individual y arrojar resultados en forma mucho más rápida, resulta una prueba útil para definir tempranamente el manejo a seguir con un paciente que tenga exudado linfocitario: si es positiva habría razones válidas para comenzar el tratamiento anti-tuberculoso y si es negativa para no hacerlo. Sin embargo estos resultados deben ser analizados en el contexto clínico del paciente y deben confirmarse con el patrón de oro (ZN, cultivo y biopsia), ya que los valores predictivos no son suficientemente buenos (VPP: 75% y VPN: 90.6%) para usar la RT – PCR como un método diagnóstico definitivo; y, de hecho, se presentaron dos falsos positivos en donde

el diagnóstico fue mesotelioma y pleuritis crónica con hiperplasia mesotelial, respectivamente.

Para el presente estudio se utilizó un patrón de oro combinado lo que permitió tener un diagnóstico definitivo y objetivo de TBP, y de esta manera hacer una evaluación más precisa de las características operativas de la prueba en estudio, convirtiéndose en una fortaleza para la presente investigación. Sin embargo, debemos señalar que como debilidad del estudio está el tamaño muestral, que resultó bajo para los hallazgos finalmente encontrados, lo cual aumentó los intervalos de confianza y disminuyó la precisión del estudio. Esto nos obliga a sugerir la realización de estudios de validación de la RT-PCR con mayores tamaños muestrales, para aumentar la precisión de los resultados.

7. CONCLUSIONES

La RT – PCR para *MTb* en líquido pleural tiene una buena especificidad para el diagnóstico de TBP, pero debido a que sus valores predictivos no son suficientemente altos, no debe utilizarse para el diagnóstico definitivo de la enfermedad. Su mayor utilidad sería como método para definir rápidamente la conducta a seguir con un paciente, mientras llegan los reportes de las pruebas diagnósticas definitivas. Los cultivos para *MTb* y los ZN de líquido y tejido pleural tienen menor rendimiento diagnóstico que la RT – PCR y es necesario seguir usando el patrón de oro combinado para establecer el diagnóstico definitivo de la pleuritis linfocitaria.

Es necesario realizar nuevos estudios con un mayor tamaño muestral con el fin de aumentar la precisión de los resultados previamente establecidos.

8. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

El desarrollo del presente trabajo se realizó basados en la resolución número 8430 de 1993(Octubre 4) por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y donde el ministro de salud en ejercicio de sus atribuciones legales en especial las conferidas por el decreto 2164 de 1992 y la Ley 10 de 1990 determina(**Art. 1.**) las disposiciones de estas normas científicas las cuales tienen por objeto establecer los requisitos para el desarrollo de la actividad investigativa en salud. Para efectos de este reglamento, la investigación de que trata el presente trabajo pertenece a la categoría (**Art. 11.**) de riesgo mínimo ya que se trata de un estudio de corte transversal que empleó el registro de datos a través de revisión de historias clínicas y entrevistas para extraer resultados de datos clínicos y paraclínicos (microbiología, patología y biología molecular) realizados al paciente como parte de métodos tradicionales de diagnóstico (patrón de oro: estudio de líquido pleural y tejido pleural) en nuestra institución para estudio de TBP. Adicionalmente se tomó una pequeña cantidad

de líquido pleural del ya tomado al paciente, para procesar la RT –PCR sondas de hibridación que es la prueba en investigación. Se debe aclarar que para esto no se requirió realizar intervenciones invasivas adicionales a las que se requieren para su estudio habitual y que el realizar esta prueba en el líquido pleural extraído no representó ningún riesgo para la vida e integridad del paciente. Por ende no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaron en el estudio.

El investigador principal se comprometió a suspender la investigación de inmediato, al advertir algún riesgo o daño para la salud del sujeto en quien se realizó la investigación. Así mismo, existía la posibilidad de excluir de inmediato aquellos sujetos de investigación que así lo hubieren solicitado **(Art.12)**.

Se diseñó un Consentimiento Informado (Ver anexo 6.) para dejar una constancia escrita del acuerdo mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna **(Art.14.)**.

9. CONFLICTOS DE INTERES Y FINANCIACIÓN

Declaramos no tener conflictos de interés. Esta publicación fue financiada por los autores.

10. CRONOGRAMA

Responsables (Autoras)		MESES (2011-2012-2013)																							
Dra. Ana María Cardinas / Dra. Martha Alejandra Casallas Rivera		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	
FASE 1. CONCEPCION	Concepción de la idea preliminar																								
	Revisión de la literatura																								
	Planteamiento de la pregunta y los objetivos																								
	Construcción del marco teórico																								
FASE 2. PLANIFICACION	Selección del diseño																								
	Selección de la muestra																								
	Definición de las intervenciones y la medición																								
FASE 3. IMPLEMENTACION	Recolección de datos periodo (2009-Nov2011)									Durante el mes de Octubre, Noviembre, Diciembre y Enero se revisó la información para la parte retrospectiva del estudio. Los pacientes que ya fueron estudiados por derrame pleural desde el año 2009 hasta Noviembre de 2011															
	Recolección de datos periodo Noviembre 2011 hasta completar la muestra											Se hará a partir del mes de Febrero de 2012 hasta que se complete el tamaño de la muestra, con presentación del proyecto a Hospital Santa Clara y Hospital Militar central buscando su colaboración para ampliar la muestra calculada													
FASE 4. ANALISIS	Análisis de los datos											Tabulación													
	Interpretación de los resultados																								
FASE 5. COMUNICACIÓN	Presentación a Hospital Universitario de la Samaritana y Universidad de la Sabana																						31/01/13 Y 1/02/13		
	Publicación revista indexada																						Por definir		
	Presentación en congreso																						Mayo 2013		

11. PRESUPUESTO

Gastos	Ingresos				TOTAL
	Universidad de la Sabana	Hospital Universitario de la Samaritana	Fondos de estudiantes U. de la Sabana	Autoras	
Papelería (Fotocopias e impresiones)				500.000	800.000
Computador y Scanner (Alquiler)				300.000	
Pruebas diagnósticas (RT –PCR sondas de hibridación) \$235.000 cada prueba	1.645.000 (7 pruebas) ⁴	9.400.000 (40 pruebas) ⁵			11.045.000
Asesor Temático* y Paola Santander* (Coautores)		1.000.000 1.000.000			5.200.000
Asesor metodológico* (Coautor)	2.000.000				
Autoras*				1.000.000	
Digitador¹				100.000	
Encuestador²				100.000	
Publicación (Inscripción a revista indexada, traducción, edición, gastos de envío y viáticos de 1 expositor) ³	3.000.000				3.000.000
Presentación congreso internacional (Inscripción, traducción, gastos de envío, poster (diseño e impresión) y viáticos de 1 expositor) ³			6.500.000		6.500.000
TOTAL	6.645.000	11.400.000	6.500.000	2.000.000	26.545.000

Aclaraciones del presupuesto:

*Coautores y Autoras: No tendrán remuneración ni en tiempo ni en dinero.

1 y 2 Digitador y Encuestador: Serán las autoras por lo cual no tendrán remuneración.

3 Los autores principales serán los únicos delegados a representar el presente trabajo como expositores en publicaciones y congresos nacionales o internacionales o en su defecto alguien asignado por los autores principales.

4 Pago de RT - PCR en LP realizada a pacientes provenientes de otros Hospitales diferentes al HUS que cumplan con los criterios de inclusión.

5 RT - PCR realizadas en HUS como parte de estudio habitual de los pacientes con derrame pleural desde el año 2009 hasta la fecha cubiertos por el POS.

12. ANEXOS

Anexo 1.

Prevalencia de Tuberculosis (TB) en el Hospital Universitario de la Samaritana del 1 de Septiembre de 2009 al 31 de Diciembre de 2011

Infección por <i>M. tuberculosis</i>	AÑO 2009	AÑO 2010	AÑO 2011
TB pulmonar	18	13	8
TB pleural	6	11	1
TB ganglionar	1		
TB meníngea	4	2	1
TB peritoneal		1	
Otros tipos de TB	4	7	4
Total casos de Infección por <i>M. tuberculosis</i>	33	34	14

Anexo 2. Instrumento de recolección de datos

DATOS PERSONALES	
Número de HC. _____	Número de cédula: _____ EDAD: _____ años GÉNERO: M__ F__
PROCEDENCIA: _____	Teléfono: _____ Fecha de ingreso: D /M /A
Diagnóstico de ingreso: _____	
Diagnóstico de egreso: _____	
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS:	
1. Citoquímico líquido pleural:	
Fecha de estudio: D /M /A	Relación LDH líquido/ suero >0.6 ___ <0.6 ___ Linfocitos ___ %
	Relación Proteínas de líquido/ suero >0.5 ___ <0.5 ___ Neutrófilos ___ %
LDH de líquido > 2/3 del límite superior normal de LDH sérico	Si ___ No ___ Cuanto? _____
Otras características _____	
2. Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> de líquido pleural	
Fecha de estudio: D /M /A	Tipo: _____ Positivo ___ Negativo ___
3. ZN en líquido pleural	
Fecha de estudio: D /M /A	Positivo ___ Negativo ___
4. PCR en tiempo real en líquido pleural	
Fecha de estudio: D /M /A	Positivo ___ Negativo ___
5. Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> de tejido pleural	
Fecha de estudio: D /M /A	Tipo: _____ Positivo ___ Negativo ___
6. ZN en tejido pleural	
Fecha de estudio: D /M /A	Positivo ___ Negativo ___
7. PCR en tiempo real en tejido pleural	
Fecha de estudio: D /M /A	Positivo ___ Negativo ___
8. Histología	
Fecha de estudio: D /M /A	Granuloma ___ Inespecífico _____
9. Clínica	
Dolor pleurítico ___ Tos ___	Disnea ___ Pérdida de peso ___
Astenia y adinamia ___ Diaforesis ___	Fiebre ___ Otro. Especifique. _____
Hallazgos radiológicos _____	

Anexo 5. Consentimiento informado

Consentimiento Informado para recolección de datos de historia clínica

Número de estudio – Comité de Investigaciones HUS (IRB): _____

- Nombre del paciente: _____
- Número de identificación del paciente/HC: _____

A Ud. (o a su acudiente) se le ha pedido que participe en un estudio de investigación denominado “Características operativas de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real sondas de hibridación para el diagnóstico de tuberculosis pleural”.

Por medio de este estudio los investigadores (Alejandra Casallas Rivera, Ana María Cárdenas, Luis Fernando Giraldo, Enrique Prieto y Paola Santander) tratarán de establecer un mejor y más rápido método diagnóstico para la tuberculosis pleural.

PROPOSITO DEL ESTUDIO

Este estudio busca validar una prueba diagnóstica que contribuiría a realizar un diagnóstico rápido y confiable para la tuberculosis pleural.

DURACIÓN

El estudio requiere un tiempo aproximado de 6 meses a partir del momento en que se realiza la toma de la muestra de líquido o tejido pleural hasta finalizar el seguimiento clínico en el caso que se requiera.

PROCEDIMIENTO

Se utilizarán los datos del estudio del líquido y/o tejido pleural que se realizan de forma tradicional para el diagnóstico de tuberculosis pleural y adicionalmente al líquido tomado se le aplicará la prueba de PCR en tiempo real sondas de hibridación, sin que esto implique realizar un nuevo procedimiento invasivo para el paciente ni un riesgo adicional para su integridad. Se tomarán datos clínicos y paraclínicos de la historia clínica que contribuyan a confirmar o descartar el diagnóstico de tuberculosis pleural.

BENEFICIOS

Contribuir en la búsqueda de un método diagnóstico que nos permita establecer de forma temprana la confirmación o descarte de tuberculosis pleural, lo cual permite el inicio de tratamiento dirigido de forma oportuna y así evitar la exposición a fármacos sin un diagnóstico claro, hospitalizaciones prolongadas y las complicaciones que esto conlleva.

CONFIDENCIALIDAD

La información obtenida será confidencial y no será utilizada con otros fines diferentes a los expuestos en el presente documento. Los hallazgos obtenidos serán presentados en comités de investigación manteniendo en completa privacidad los datos personales de cada paciente.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

La participación en el presente estudio de investigación es absolutamente voluntaria, por lo tanto no habrá ningún tipo de remuneración económica o compensación por su participación. El paciente puede negarse a participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee después de haber ingresado, lo cual deberá ser notificado a cualquiera de los investigadores por vía telefónica, comunicándose al teléfono 4077075 Ext 10554. En caso de hallazgos relevantes para el estado de salud del paciente o de su familia se le comunicará por vía telefónica. Tenga en cuenta que independiente de su participación o no, se seguirá prestando el servicio de atención en salud, y participar o no en el estudio no afectará dicha atención.

Certifico que he leído y comprendido todo lo anterior; que los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma y que me encuentro en capacidad física y mental de expresar mi libre decisión.

El participante en la investigación ha elegido participar en este estudio o proyecto de investigación libre y voluntariamente y en constancia de ello firma el presente documento.

Puede ponerse en contacto con el **Comité de ética en Investigación** del Hospital Universitario de la Samaritana al teléfono 407-7075 extensión 10290 si tiene alguna pregunta sobre sus derechos como sujeto de investigación.

Si accede a participar debe dársele una copia firmada de este documento. Al firmar este documento Ud. indica que el estudio de investigación, incluyendo la información precedente, le ha sido descrito verbalmente y que voluntariamente accede a participar.

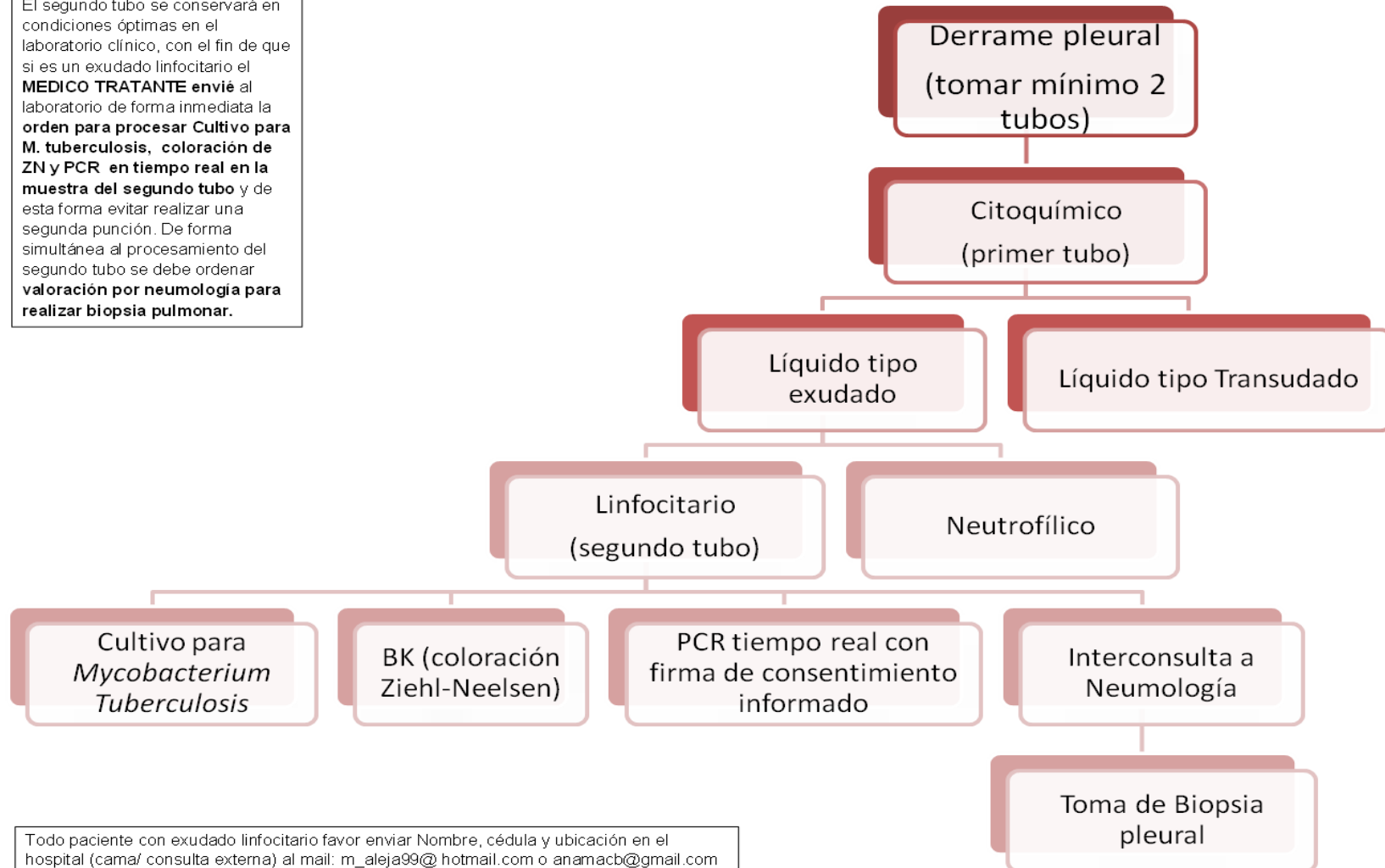
	/ /	
Firma del sujeto voluntario	Día / Mes / Año	Nombre completo (letra legible)
	/ /	
Firma del testigo # 1	Día / Mes / Año	Nombre completo (letra legible)
	/ /	
Firma del testigo # 2	Día / Mes / Año	Nombre completo (letra legible)
	/ /	
Firma del Investigador	Día / Mes / Año	Nombre completo

Si, el sujeto de investigación ha decidido **NO PARTICIPAR** en este proyecto de investigación hace constancia con su firma:

	/ /	
Firma del sujeto voluntario	Día / Mes / Año	Nombre completo (letra legible)

Anexo 6. Flujograma de Diagnóstico TBP.

El segundo tubo se conservará en condiciones óptimas en el laboratorio clínico, con el fin de que si es un exudado linfocitario el **MEDICO TRATANTE envíe** al laboratorio de forma inmediata la **orden para procesar Cultivo para M. tuberculosis, coloración de ZN y PCR en tiempo real en la muestra del segundo tubo** y de esta forma evitar realizar una segunda punción. De forma simultánea al procesamiento del segundo tubo se debe ordenar **valoración por neumología para realizar biopsia pulmonar.**



Todo paciente con exudado linfocitario favor enviar Nombre, cédula y ubicación en el hospital (cama/ consulta externa) al mail: m_aleja99@hotmail.com o anamacb@gmail.com

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Lamsal M, Gautam N, Bhatta N, Majhi S, Baral N, Bhattacharya SK. Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007 Mar;38(2):363-9.
2. Vélez H RW, Borrero J, Restrepo J, Torres C, Awad C, Maldonado D y Chaparro C. . NEUMOLOGÍA. Fundamentos de Medicina. edición, editor. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007.
3. Salud OPdl. "En el 2010, se estiman 11.200 casos de tuberculosis en Colombia". 2010; Available from: http://new.paho.org/col/index.php?option=com_content&task=view&id=1022&Itemid=469.
4. GP KPaK. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control.; 1985.
5. Trajman A, Pai M, Dheda K, van Zyl Smit R, Zwerling AA, Joshi R, et al. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? *Eur Respir J*. 2008 May;31(5):1098-106.
6. Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *Lancet*. 2010 May 29;375(9729):1920-37.
7. Kunnath-Velayudhan S, Gennaro ML. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Oct;24(4):792-805.
8. Villena V, Lopez-Encuentra A, Pozo F, Echave-Sustaeta J, Ortuno-de-Solo B, Estenoz-Alfaro J, et al. Interferon gamma levels in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis. *Am J Med*. 2003 Oct 1;115(5):365-70.
9. K. S. Escenario de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como prueba diagnóstica en tuberculosis. *Gac Méd Caracas*. 2009;117:6.
10. Organization WH. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva2006.
11. Jimenez Castro D, Diaz Nuevo G, Perez-Rodriguez E, Light RW. Diagnostic value of adenosine deaminase in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. *Eur Respir J*. 2003 Feb;21(2):220-4.
12. pública IndsSdvycs. Boletín Epidemiológico semanal. 2012.

13. Lancelot M, Pinto JG, Samuel G, Schumacher, Claudia M, Denkinger, Karen R, Steingart, Madhukar Pai. Immunodiagnosis of Tuberculosis: State of the Art. *Med Princ Pract* 2012. [Review]. 2011;21:10.
14. Villegas MV, Labrada LA, Saravia NG. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon-gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest*. 2000 Nov;118(5):1355-64.
15. Light RW. Clinical practice. Pleural effusion. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1971-7.
16. Palomino JC LSaRV. Tuberculosis 2007. primera edición ed2007.
17. JM. P. Tuberculous pleural effusion. *Lung*. 2009;187(5):8.
18. Moudgil H, Sridhar G, Leitch AG. Reactivation disease: the commonest form of tuberculous pleural effusion in Edinburgh, 1980-1991. *Respir Med*. 1994 Apr;88(4):301-4.
19. Stead WW, Eichenholz A, Stauss HK. Operative and pathologic findings in twenty-four patients with syndrome of idiopathic pleurisy with effusion, presumably tuberculous. *Am Rev Tuberc*. 1955 Apr;71(4):473-502.
20. RW. L. Pleural Diseases. Quinta edición ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.
21. Levine H, Szanto PB, Cugell DW. Tuberculous pleurisy. An acute illness. *Arch Intern Med*. 1968 Oct;122(4):329-32.
22. JK SHaM. Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. American Society for Microbiology. 1983.
23. Scharer L, McClement JH. Isolation of tubercle bacilli from needle biopsy specimens of parietal pleura. *Am Rev Respir Dis*. 1968 Mar;97(3):466-8.
24. Udawadia ZF, Sen T. Pleural tuberculosis: an update. *Curr Opin Pulm Med*. 2010 Jul;16(4):399-406.
25. Villena Garrido V FSJ, Hernández Blasco L, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Rodríguez Panadero F, Romero Candeira S, Salvatierra Velázquez A, Valdés Cuadrado L. [Diagnosis and treatment of pleural effusion]. *Arch Bronconeumol*. 2006;42(7):24.
26. J. C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:6.
27. Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res*. 2006 Oct;124(4):385-98.

28. Shain EB, Clemens JM. A new method for robust quantitative and qualitative analysis of real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2008 Aug;36(14):e91.
29. Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford JM, Jr. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2004 Feb 23;4:6.
30. Chakravorty S, Sen MK, Tyagi JS. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4357-62.
31. Liu KT, Su WJ, Perng RP. Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. *J Chin Med Assoc.* 2007 Apr;70(4):148-51; discussion 6-7.
32. Kalantri Y, Hemvani N, Chitnis DS. Evaluation of real-time polymerase chain reaction, interferon-gamma, adenosine deaminase, and immunoglobulin A for the efficient diagnosis of pleural tuberculosis. *Int J Infect Dis.* 2011 Apr;15(4):e226-31.
33. David Machin MJC, Say Beng Tan, and, Tan SH. *Sample Size Tables for Clinical Studies.* Tercera edición ed: Blackwell Publishing; 2009.
34. Li J, Fine J. On sample size for sensitivity and specificity in prospective diagnostic accuracy studies. *Stat Med.* 2004 Aug 30;23(16):2537-50.

RESUMEN ANALÍTICO DE INVESTIGACIÓN (R.A.I)

No.	VARIABLES	DESCRIPCIÓN DE LA VARIABLE
1	NOMBRE DEL POSTGRADO	Especialización en Medicina Interna
2	TÍTULO DEL PROYECTO	VALIDEZ DIAGNÓSTICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL PARA TUBERCULOSIS PLEURAL
3	AUTOR(es)	Casallas Rivera Martha Alejandra, Cárdenas Bernal Ana María
4	AÑO Y MES	Febrero de 2013
5	NOMBRE DEL ASESOR(a)	Giraldo Cadavid Luis Fernando
6	DESCRIPCIÓN O ABSTRACT	<p>Introducción. Para el diagnóstico de tuberculosis pleural (TBP) el patrón de oro es invasivo y demorado.</p> <p>Métodos. Validez de la RT – PCR comparada con un patrón de oro compuesto. Incluimos pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario. Se consideró diagnóstico de TBP si el paciente tenía mínimo una de tres pruebas positiva: ZN o cultivo para MTb en líquido o tejido pleural o biopsia pleural; se descartó TBP si las tres pruebas eran negativas.</p> <p>Resultados. RT – PCR mostró una sensibilidad del 66,7%, una especificidad del 93,5%, un VPP de 75% y un VPN de 90,6%.</p> <p>Conclusiones. La RT - PCR para TBP no es un método diagnóstico definitivo, permite definir rápidamente el manejo, mientras llegan reportes de pruebas diagnósticas definitivas.</p> <p>ABSTRACT</p> <p>Introduction: For the diagnosis of pleural tuberculosis (PTB) the gold standard are invasive and delayed.</p> <p>Methods: The validity of the RT - PCR compared with a gold standard composed. We included patients seen because of lymphocytic pleural exudates. Diagnosis of PTB was confirmed if least one of three tests were positive: Ziehl-Neelsen or culture for MTb in pleural fluid or tissue or pleural biopsy; PTB was discard when all tests were negative.</p> <p>Results. RT-PCR showed a sensitivity of 66.7%, a specificity of 93.5% ,a PPV of 75% and a NPV of 90.6%</p> <p>Conclusions. The RT - PCR for PTB is not a method of definitive diagnosis, but allows quickly define the management, while reaching the reports of definitive diagnostic tests.</p>
7	PALABRAS CLAVES	Biología molecular, derrame pleural, Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, granulomas, hiperplasia, mesotelioma, diagnóstico, exudado y estudios de validación.
8	SECTOR ECONÓMICO AL QUE PERTENECE EL PROYECTO	Ninguno
9	TIPO DE ESTUDIO	Estudio de validación de pruebas diagnósticas de corte transversal
10	OBJETIVO GENERAL	Establecer las características operativas de la RT –PCR sondas de hibridación, para el diagnóstico de tuberculosis pleural en pacientes con derrame pleural tipo exudado linfocitario.
11	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Determinar la sensibilidad y especificidad de la RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural para diagnóstico de TBP. 2. Precisar el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural para diagnóstico de TBP. 3. Fijar los falsos positivos y negativos de la RT –PCR sondas de hibridación en líquido pleural para diagnóstico de TBP. 4. Comparar la sensibilidad y especificidad de cultivo de M. tuberculosis y PCR en líquido pleural para diagnóstico de TBP. 5. Comparar la sensibilidad y especificidad del Ziehl- Neelsen y PCR en líquido pleural para diagnóstico de TBP.
12	RESUMEN GENERAL	<p>Introducción. Para el diagnóstico de tuberculosis pleural (TBP) el patrón de oro es invasivo y demorado, lo que dificulta el inicio oportuno del tratamiento.</p> <p>La RT – PCR ha demostrado ser rápida para el diagnóstico de TBP, pero la evidencia para su validación en TBP aún es débil y las sensibilidades reportadas han sido subóptimas.</p> <p>Métodos. Se evaluó la validez de la RT – PCR comparada con un patrón de oro compuesto mediante un estudio transversal en un hospital universitario de nivel III. Se incluyeron pacientes estudiados consecutivamente por derrame pleural tipo exudado linfocitario. Se consideró como patrón de oro para el diagnóstico de TBP si el paciente tenía al menos una de las siguientes tres pruebas positiva: ZN o cultivo para MTb en líquido o tejido pleural o biopsia pleural con granulomas; se descartó TBP si las tres pruebas eran negativas. Se consideró como caso probable si el patrón de oro era negativo pero la RT- PCR positiva y el ADA mayor de 47UI/L. Finalmente se determinaron las características operativas de la RT- PCR, mediante la Prueba Mid-P Exact, con el Software OpenEpi 2.3 (2009).</p> <p>Resultados. La RT – PCR mostró una sensibilidad del 66,7% (IC 95%: 33,2% - 90,7%) y una especificidad del 93,5% (IC 95%: 80,3% - 98,9%). La prevalencia de TBP en los exudados linfocitarios estudiados fue del 22.5%, con un VPP de 75% (IC 95%: 38,8% - 95,6%) y un VPN de 90,6% (IC 95%: 76,6% - 97,6%). Se encontraron 2 falsos positivos para la RT – PCR, uno con mesotelioma pleural y otro con pleuritis crónica con hiperplasia mesotelial.</p> <p>Conclusiones. La RT - PCR para MTb en líquido pleural no debería utilizarse como método diagnóstico definitivo sino para definir rápidamente el manejo, mientras llegan los reportes de las pruebas diagnósticas definitivas.</p>
13	CONCLUSIONES.	<p>La RT – PCR para MTb en líquido pleural tiene una buena especificidad para el diagnóstico de TBP, pero debido a que sus valores predictivos no son suficientemente altos, no debe utilizarse para el diagnóstico definitivo de la enfermedad. Su mayor utilidad sería como método para definir rápidamente la conducta a seguir con un paciente, mientras llegan los reportes de las pruebas diagnósticas definitivas. Los cultivos para MTb y los ZN de líquido y tejido pleural tienen menor rendimiento diagnóstico que la RT – PCR y es necesario seguir usando el patrón de oro combinado para establecer el diagnóstico definitivo de la pleuritis linfocitaria.</p> <p>Es necesario realizar nuevos estudios con un mayor tamaño muestral con el fin de aumentar la precisión de los resultados previamente establecidos.</p>

14	FUENTES BIBLIOGRÁFICAS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lamsal M, Gautam N, Bhatta N, Majhi S, Baral N, Bhattacharya SK. Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients. <i>Southeast Asian J Trop Med Public Health</i>. 2007 Mar;38(2):363-9. 2. Vélez H RW, Borrero J, Restrepo J, Torres C, Awad C, Maldonado D y Chaparro C. . NEUMOLOGÍA. Fundamentos de Medicina. edición, editor. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. 3. Salud OPdl. "En el 2010, se estiman 11.200 casos de tuberculosis en Colombia". 2010; Available from: http://new.paho.org/col/index.php?option=com_content&task=view&id=1022&Itemid=469. 4. GP KPaK. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control.; 1985. 5. Trajman A, Pai M, Dheda K, van Zyl Smit R, Zwerling AA, Joshi R, et al. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not? <i>Eur Respir J</i>. 2008 May;31(5):1098-106. 6. Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. <i>Lancet</i>. 2010 May 29;375(9729):1920-37. 7. Kunnath-Velayudhan S, Gennaro ML. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. <i>Clin Microbiol Rev</i>. 2011 Oct;24(4):792-805. 8. Villena V, Lopez-Encuentra A, Pozo F, Echave-Sustaeta J, Ortuno-de-Solo B, Estenoz-Alfaro J, et al. Interferon gamma levels in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis. <i>Am J Med</i>. 2003 Oct 1;115(5):365-70. 9. K. S. Escenario de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como prueba diagnóstica en tuberculosis. <i>Gac Méd Caracas</i>. 2009;117:6. 10. Organization WH. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva2006. 11. Jimenez Castro D, Diaz Nuevo G, Perez-Rodriguez E, Light RW. Diagnostic value of adenosine deaminase in nontuberculous lymphocytic pleural effusions. <i>Eur Respir J</i>. 2003 Feb;21(2):220-4. 12. pública IndsDvycs. Boletín Epidemiológico semanal. 2012. 13. Lancelot M, Pinto JG, Samuel G, Schumacher, Claudia M, Denkinger, Karen R, Steingart, Madhukar Pai. Immunodiagnosis of Tuberculosis: State of the Art. <i>Med Princ Pract</i> 2012. [Review]. 2011;21:10. 14. Villegas MV, Labrada LA, Saravia NG. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon-gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. <i>Chest</i>. 2000 Nov;118(5):1355-64. 15. Light RW. Clinical practice. Pleural effusion. <i>N Engl J Med</i>. 2002 Jun 20;346(25):1971-7. 16. Palomino JC LSaRV. Tuberculosis 2007. primera edición ed2007. 17. JM. P. Tuberculous pleural effusion. <i>Lung</i>. 2009;187(5):8. 18. Moudgil H, Sridhar G, Leitch AG. Reactivation disease: the commonest form of tuberculous pleural effusion in Edinburgh, 1980-1991. <i>Respir Med</i>. 1994 Apr;88(4):301-4. 19. Stead WW, Eichenholz A, Stauss HK. Operative and pathologic findings in twenty-four patients with syndrome of idiopathic pleurisy with effusion, presumably tuberculous. <i>Am Rev Tuberc</i>. 1955 Apr;71(4):473-502. 20. RW. L. Pleural Diseases. Quinta edición ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. 21. Levine H, Szanto PB, Cugell DW. Tuberculous pleurisy. An acute illness. <i>Arch Intern Med</i>. 1968 Oct;122(4):329-32. 22. JK SHaM. Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. American Society for Microbiology. 1983. 23. Scharer L, McClement JH. Isolation of tubercle bacilli from needle biopsy specimens of parietal pleura. <i>Am Rev Respir Dis</i>. 1968 Mar;97(3):466-8. 24. Udwardia ZF, Sen T. Pleural tuberculosis: an update. <i>Curr Opin Pulm Med</i>. 2010 Jul;16(4):399-406. 25. Villena Garrido V FSJ, Hernández Blasco L, de Pablo Gafas A, Pérez Rodríguez E, Rodríguez Panadero F, Romero Candeira S, Salvatierra Velázquez A, Valdés Cuadrado L. [Diagnosis and treatment of pleural effusion]. <i>Arch Bronconeumol</i>. 2006;42(7):24. 26. J. C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin</i>. 2004;22:6. 27. Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. <i>Indian J Med Res</i>. 2006 Oct;124(4):385-98. 28. Shain EB, Clemens JM. A new method for robust quantitative and qualitative analysis of real-time PCR. <i>Nucleic Acids Res</i>. 2008 Aug;36(14):e91. 29. Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford JM, Jr. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. <i>BMC Infect Dis</i>. 2004 Feb 23;4:6. 30. Chakravorty S, Sen MK, Tyagi JS. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. <i>J Clin Microbiol</i>. 2005 Sep;43(9):4357-62. 31. Liu KT, Su WJ, Perng RP. Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. <i>J Chin Med Assoc</i>. 2007 Apr;70(4):148-51; discussion 6-7. 32. Kalantri Y, Hemvani N, Chitnis DS. Evaluation of real-time polymerase chain reaction, interferon-gamma, adenosine deaminase, and immunoglobulin A for the efficient diagnosis of pleural tuberculosis. <i>Int J Infect Dis</i>. 2011 Apr;15(4):e226-31. 33. David Machin MJC, Say Beng Tan, and, Tan SH. Sample Size Tables for Clinical Studies. Tercera edición ed: Blackwell Publishing; 2009. 34. Li J, Fine J. On sample size for sensitivity and specificity in prospective diagnostic accuracy studies. <i>Stat Med</i>. 2004 Aug 30;23(16):2537-50.
----	------------------------	--