

**MODERNAS TECNICAS DE DETECCION DE LA TUBERCULOSIS POR EL
LABORATORIO**

**Dra. Maria del Carmen Maroto Vela
Académico de Honor**

En el año 1809, Johann Wolfgang Goethe, el gran literato alemán, termina su novela "Las afinidades electivas", novela en la que estudia minuciosamente las tendencias sentimentales de los seres humanos, tan minuciosamente como era capaz de llevar a cabo sus investigaciones científicas; porque Goethe, además de ser un gran escritor, fue también un amante de la ciencia en materia de biología. En ella describe las relaciones afectivas entrecruzadas de sus protagonistas, que quedan nitidamente explicadas como en una pizarra; en ella se comprueba cómo entre las personas, entre los ambientes, entre las profesiones, existen esos puntos de unión, esos lazos invisibles capaces de atar de forma indeleble; en resumen, esas afinidades que nos hacen aproximarnos a distintas personas o distintos grupos, que enriquecen a ambos, y que jamás entran en colisión. Como la propia afinidad entre Goethe y el gran poeta Schiller, que hizo exclamar a este último: "No me mido con Goethe cuando pone en su obra todo su genio, lo tiene más que yo, y también conocimientos más numerosos; y, además, un sentido artístico más fino".

Pues bien, esas afinidades han hecho que la Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, mis amigos veterinarios, me hicieron el grandísimo honor de poder estar, permanecer y trabajar entre ellos. Mis amigos veterinarios con los cuales jamás hay colisión, porque tienen muy definidas sus ideas y campos. Mis amigos veterinarios, que ejercen su profesión de una forma callada y científica. Mis amigos veterinarios que, al igual que le ocurría a Schiller con Goethe, hacen que yo proclame que sus conocimientos son más numerosos y mejores que los míos. Y sin embargo, me han nombrado Académico de Honor. ¡Qué gran honor para mí! ¡Qué gratitud la mía! ¡Qué afinidades científicas y afectivas existen entre ambos...! Ante ello, sólo puedo decir.... Muchas gracias, amigos.

Durante el desarrollo del Cinquecento, Alessandro di Mariano (llamado Sandro) Botticelli, pintó en la ciudad de Florencia, para su Mecenas Lorenzo di Pierfrancesco Médicis para su villa de Castello, una maravillosa obra, "El nacimiento de Venus", inspirada en su modelo, joven bellísima, Simonetta Catherina Vespucci. Simonetta murió pocos años después de la enfermedad imperante y que ya empezaba a estar de moda en la época, la Tuberculosis. Sus mórbidas formas fueron desapareciendo para transformarse en la delgadez extrema típica de la caquexia final; el rosado de su piel, animado con un claroscuro de tan leves gradaciones que la carne adquiere irisaciones, se convirtió en la palidez típica de la anemia, sólo manchada por el color rojo de las mejillas que aparecía al caer la tarde como consecuencia de la fiebre; la viveza y alegría de sus ojos se convirtieron en luces mortecinas que igualmente sólo brillaban con la fiebre; y su elan vital, su fuerza vital, ese que le llevó a representar en su otro cuadro, "La Primavera" a la misma figura femenina vestida con una túnica vaporosa ornada con todas las flores, es decir, a Flora, como el momento más pujante del año, ese momento en el cual todo comienza a nacer y vivir, que es la primavera, esa fuerza se convirtió en una suave dejadez, una dulce displicencia; en resumen, una astenia, signo típico también de la enfermedad. Esa enfermedad que afectó a un número importante de la masa trabajadora, pero que no respetó a músicos, literatos y artistas, impregnando con sus características sus obras de arte, y marcando con un sello indeleble la sociedad romántica que moría, pero, eso sí, moría llena de belleza.

Esa enfermedad, la Tuberculosis, que ha renacido como el Ave Fénix entre las cenizas que creíamos apagadas, ha sido el tema escogido para hablarles a ustedes.

El estudio de nuestra exposición lo hemos dividido en cuatro grandes apartados en los que, tras una somera puesta a punto de los aspectos actuales sobre la Tuberculosis, comentaremos cómo se diagnostica de una forma general, para dedicar algo más de tiempo a la utilización de la Biología Molecular con este fin, y a nuestra experiencia en el diagnóstico de los procesos extra-respiratorios, preferentemente los de origen dérmico.

1.- Aspectos actuales de la Tuberculosis.

La tuberculosis, que durante mucho tiempo estuvo ligada, epidemiológicamente a problemas socioeconómicos así como a vías de transmisión por contacto con animales enfermos, ha cambiado en algunos aspectos. Por ejemplo, según datos recientes suministrados por nuestra amiga la Dra Pilar Ayuso, Directora General de Política Alimentaria del Ministerio de Agricultura y Pesca, referidos a los últimos seis años, el porcentaje de positividad de tuberculosis bovina ha ido descendiendo de forma paulatina desde el 3,70% en 1990, hasta un 1,38% en 1995 con el consiguiente aumento de establos libres de infección, desde un 89,2% hasta un 94,7%. En el año 1.996, dicho porcentaje se ha incrementado ligeramente, siendo las provincias infectadas más altas las de Andalucía, Extremadura, etc. En cualquier caso, cifras que no justificarían, en absoluto, el incremento al que estamos asistiendo en el mundo.

La causa o causas de dicho incremento serían, según Billo, (1.996) la aparición de la nueva epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana, la presencia de grandes masas de personas que huyen de países con escasos recursos económicos; la aparición concomitante (y causante) con el VIH de la drogadicción; el incremento de las bolsas de pobreza en muchas zonas y países y, por supuesto, la

falta de estructuras médicas adecuadas y de programas contra la enfermedad. Según Sauret (1996), además del deterioro de las condiciones socioeconómicas, sobre todo en las grandes urbes, el alargamiento de la expectativa de vida con un incremento importante en el número de ancianos y el hacinamiento de individuos internados en asilos y prisiones, serían también factores favorecedores.

Durante la década de los ochenta, la ciudad de Nueva York sufrió un importantísimo incremento que asustó a las autoridades sanitarias, y los estudios epidemiológicos de Driver (1996) demostraron que las causas eran las mismas citadas por los anteriores autores: epidemia VIH, cambios sociales con hacinamiento de colectivos en albergues variados, de tal manera que determinados Centros Penitenciarios de Nueva York han llegado a tener tasas de hasta 180 por 100.000, disminución de fondos y personal para su control, así como reducción del número de clínicas específicas, que pasaron de 24 a 8; presencia de inmigraciones, con grandes diferencias entre el personal autóctono y el inmigrante. Por ejemplo, según el MMWR (1990), la tasa en los individuos americanos sería del 9,5, mientras que en los "foreing" alcanzaría cifras de hasta el 124 por 100.000; y, por último, problemas en la realización de un tratamiento adecuado, bien por ser éste incompleto, bien por la aparición de fenómenos de resistencias a las drogas antituberculosas.

En realidad, si nos fijamos, son las mismas causas que hicieron aparecer los grandes brotes del siglo XIX (pobreza, hacinamiento, promiscuidad y falta de atención sanitaria adecuada), a los que se han unido los grandes problemas de nuestro siglo, tales como los movimientos poblacionales que huyen de sus países para acabar en los confines de las grandes ciudades en grados extremos de pobreza

y, sobre todo, el SIDA. El SIDA, cuyos enfermos se encuentran muy frecuentemente afectados porque en ellos se dan todos los factores favorecedores y, que, según algunos estudios de Kindelan (1997) sigue aumentando de tal manera, que el porcentaje de coinfección en 1.990 era del 4,2%, en 1.995 de 8,4%, y se considera que en el 2000 será del 13,8%. Estas cifras son más bajas de las encontradas en la actualidad, ya que, en general, entre el 50 y el 60% de los individuos con SIDA presentan una tuberculosis, siendo muchas veces la primera enfermedad indicadora de una infección VIH subyacente (López Ruz 1997). España se encuentra a la cabeza de los países europeos en tasas acumuladas de SIDA y el 82% de los individuos está en edades tempranas. Como en esas edades estarían infectados un alto porcentaje por tuberculosis, España presenta la mayor probabilidad de coinfección de Europa. De hecho, se considera que el riesgo de padecer una tuberculosis en los individuos VIH + es del 50% frente a un 3-5% en los VIH -. Por otra parte, es precisamente en estos enfermos en los que las resistencias a las drogas es mucho más alta, llegando los fenómenos de multirresistencias hasta un 8% con los consiguientes peligros no sólo para ellos sino para sus múltiples contactos. No debemos olvidar además, que estos pacientes pueden desarrollar infecciones por otras micobacterias como *Mycobacterium avium intracellulare* y *Mycobacterium Kansasi*, etc.

2.- Tuberculosis en el mundo

Según la OMS, la tuberculosis está ampliamente extendida con tasas por encima de 100/100.000 habitantes en amplias zonas de Africa ó Sudeste Asiático, y con toda una gran variedad en otros países. Las cifras de mortalidad coinciden igualmente en los mismos. En términos generales, podemos decir que en Africa y el

Sudeste Asiático se encuentran las tasas más elevadas, con 96 y 94 por 100.000 habitantes, y las cifras intermedias en el Mediterráneo Oriental, Europa y América.

Las cifras en España varían si son suministradas por los sistemas sanitarios basados en la Declaración Obligatoria Nacional, con una tasa media de 22,3, a los suministrados, por ejemplo, por la Sociedad de Neumología en colaboración con los servicios de Microbiología, en las que prácticamente se doblan, con un 40 por 100.000. De ellas, las Comunidades más afectadas son las de Asturias, Galicia, Cataluña y Madrid.

En Andalucía, según datos de la Consejería de Salud, basados siempre en la Declaración Obligatoria Nacional, por lo tanto más bajos, la tasa media sería de 24,7 con cifras más elevadas en Málaga, Cádiz y Huelva. Estas cifras deberían ser revisables y consideradas seriamente puesto que, por ejemplo no es lógico que Sevilla presente una tasa sólo de 22,5. Granada y Jaén presentarían una de las más bajas, con 20,5, y 14,3 respectivamente.

En cualquier caso según datos de la OMS en el año 1.990, presentaría una incidencia anual de 10 millones; hoy en día, ahora, se dice que podría haber un tuberculoso nuevo en el mundo cada segundo. La prevalencia sería de 30 millones, con un número de 3 millones de muertes, lo que la convertiría en la más mortal de las enfermedades infecciosas, y un número de infectados de 1000 a 2000 millones; hoy en día, ahora, se considera que la cifra más próxima sería la de 1500 millones, lo que abarcaría casi el 25% de la población mundial.

3.- Diagnóstico General de la Tuberculosis por el laboratorio

A la vista del incremento de la tuberculosis en el mundo, los laboratorios de Microbiología se han visto obligados a reconsiderar sus actuaciones, ya que son necesarias dos cosas:

1.- En relación al enfermo: un diagnóstico rápido para el control del proceso y la terapia (Salfinger 1995).

2.- En relación al laboratorio: organización del mismo, toma de decisiones tecnológicas y estudio del coste de dichas decisiones.

Ante estos problemas, existirían diferentes soluciones, siendo una de ellas ver qué es lo que se puede hacer desde el punto de vista científico (que abarcaría todo lo que se puede hacer) y otra todo lo que se puede hacer desde el punto de vista práctico (que abarcaría todo lo que se debe hacer).

Ante ello, las posibilidades existentes en este momento son muy diversas: tinciones, cultivos en medio sólido, cultivos en medio líquido, pruebas bioquímicas, sondas de identificación, pruebas de susceptibilidad, detección por amplificación, cromatografía líquida de alta presión, tipados de ADN, secuenciación de ARN, etc.

Pero en realidad, eso no es lo que se lleva a cabo de forma rutinaria, ya que, por ejemplo, según un estudio de Denniston (1997) en USA, existe una gran diferencia entre las peticiones recibidas por los distintos laboratorios según sean estatales o no. Así, aún cuando las tinciones sean solicitadas en el 100% de ambos casos, y el cultivo prácticamente sea también muy similar (100% frente al 91%), existen diferencias notables en relación a la identificación (98 frente a 61%) o a la susceptibilidad a drogas (91 frente al 23%).

Por todo ello, creemos que el fundamento del diagnóstico de las Micobacterias se basa en tres pilares fundamentales las tinciones, los cultivos y las aplicaciones de la Biología Molecular. Porque la serología, aún cuando se ha intentado la detección de anticuerpos repetidas veces y con diferentes antígenos (Wilkinson 1997), y las intradermorreacciones, no forman parte del diagnóstico real.

3.1.-Tinciones, bien con la clásica tinción de Ziehl Neelsen o con Auramina. Es el método más clásico y rápido, y aunque es cierto que establece un diagnóstico presuntivo, carece de la suficiente sensibilidad, siendo necesarias más de 10^4 bacterias por ml de muestra para conseguir un resultado positivo.

3.2.- Cultivos, constituye el método de referencia, utilizando el clásico medio sólido de Lowenstein, en el que se aprecian las típicas colonias grandes, arrugadas, en miga de pan y que ha permitido, en algunos casos, realizar diagnósticos hasta ahora poco frecuentes, como el de un enfermo de nuestro laboratorio que presentaba un *Mycobacterium marinum* como consecuencia del manejo de peceras. Su principal problema radica en el tiempo necesario para establecer un diagnóstico (2-8 semanas).

Para solucionar este problema en la mayor parte de los laboratorios se suele utilizar una combinación de un medio sólido y uno líquido, siendo el más frecuente el radiométrico (Huebner 1993). Nó obstante, éste plantea algunas dificultades inherentes a la radiactividad, por lo que existen en el mercado sistemas automáticos o semiautomáticos en medios líquidos que han permitido acortar el tiempo del mismo (Shinnick 1995) y universalizar el diagnóstico de rutina (Stager 1991).

Nosotros, en nuestro Departamento, en la Sección de Micobacterias que dirige el Dr. Román, hemos comparado el método clásico de Lowenstein con el MB/Bact (medio Mildebrook 7H9) obteniendo un mejor porcentaje de crecimiento (93% frente a 69%), y un acortamiento en el tiempo del mismo (16 días frente a 22). La contaminación asimismo ha sido menor (5% frente a 8%). En ambos casos, el 92% de esa contaminación fue debida a cocos positivos (*Streptococcus viridans*, *Staphylococcus coagulosa* negativas, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*).

3.3.- Biología Molecular aplicada al diagnóstico de la Tuberculosis

Las modernas técnicas de Biología Molecular aplicadas a la tuberculosis nos permiten hacer dos tipos de estudios: clínicos y de investigación. A lo largo de esta exposición diremos algunas breves palabras de la utilidad en todos los aspectos generales, para estudiar, de forma más exhaustiva, los concernientes al diagnóstico clínico.

Identificación de especies. Mediante el análisis de PCR-RFLP y de secuenciación directa de 16S rDNA se ha podido estudiar e identificar especies universales y, asimismo, nuevas especies patógenas.

Estudios de resistencias. investigando las bases moleculares de los mismos. Así, hoy en día se conocen 11 genes asociados a resistencia a Isoniácida, Rifampicina, Estreptomina. Fluorquinolonas, Etambutol y Cicloserina. Estos conocimientos constituyen la base para el "diseño inteligente de medicamentos" capaces de evitar el bloqueo impuesto por las respectivas mutaciones.

Estudios epidemiológicos. El tipado genético de organismos permite una mejor caracterización de los patrones de transmisión de la tuberculosis, demostrando estas técnicas las limitaciones del estudio convencional de contactos, y permitiendo estimar la frecuencia de reactivaciones, infecciones y reinfecciones en determinados grupos de población. Por otra parte, permitiría igualmente un estudio global del proceso y un control nacional e internacional de cepas multirresistentes.

La realización y consecución de diferentes códigos de barras con diferentes bandas podría permitir hacer dendogramas capaces de facilitar los estudios epidemiológicos. Igualmente permitiría el estudio en animales. Así, Telenti asegura que las cepas aisladas en los pájaros no corresponden con la de los humanos, aunque, por el contrario, si existe similitud con las aisladas en los cerdos ya que asegura que el 5-10% están contaminadas por *Mycobacterium avium* (Telenti 1996).

Dentro de las técnicas utilizadas para los estudios epidemiológicos, la considerada como de referencia es la RFLP pero, al ser su consecución lenta (4-5 semanas), se está preconizando la utilización simple de PCR que, además de diagnóstico, (Taylor 1997) se puede utilizar para comparar cepas aisladas en la práctica diaria y ver si epidemiológicamente son las mismas (Otal 1997).

Investigación

La secuenciación completa de los genomas del bacilo de Koch y de Hansen (se piensa se puede obtener más o menos en 3-4 años), permitiría identificar una serie de genes capaces de conocer la singularidad de su pared, su virulencia, su actividad metabólica susceptible a nuevos fármacos e, incluso, la posibilidad de vacunas.

En estos campos existen graves barreras técnicas debidas a la dificultades para el intercambio genético (recombinación homóloga), o de la mutagénesis controlada del genoma micobacteriano (mutagénesis por trasposones).

En resumen, la Biología Molecular sería útil en el campo de la Epidemiología, de la Investigación y de la Microbiología Clínica, todas capaces de controlar el grave proceso de la Infección Tuberculosa.

Aplicaciones de la Biología Molecular en Microbiología Clínica

En el diagnóstico clínico de los pacientes de tuberculosis, las aplicaciones de la Biología Molecular abarcan toda una serie de posibilidades. La primera utilizada fue descrita por Hill en 1966 sobre el estudio del contenido del G+C del genoma. La utilización de sondas genéticas descrita por Patel y Kiehn en 1986 y 1987 se lleva a cabo para identificación, a partir de muestras crecidas en medio sólido. Todavía no poseen la suficiente sensibilidad para aplicarse de forma directa sobre los productos patológicos, pero han supuesto un avance importante en la identificación rápida de micobacterias aisladas.

Más modernas son las de amplificación génica tales como la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), LCR (Reacción en cadena de la ligasa) descrita por Iovannisci en 1993, la Q Beta replicasa (descrita por An en 1995), la SDA (Strand displacement amplification), descrita por Walker en 1994), el DNA fingerprinter, las ya citadas de RFPL, etc.

De todas ellas, las más utilizadas son las de PCR y LCR, preferentemente la primera. Esta, es una técnica a valorar muy bien, y que puede adolecer de una serie de problemas, tales como la aparición de falsos negativos por la presencia de

inhibidores de la Taq polimerasa, o dificultad en la ruptura de ácidos micólicos para acceder al DNA o RNA; de falsos positivos por contaminaciones; de obtención de diferentes resultados según las distintas zonas o regiones a amplificar, bien comunes a todas la micobacterias, específicas al complejo *Mycobacterium tuberculosis* o las más utilizadas recientemente, las secuencias de inserción tales como IS6110 o IS986. Y, por último, la posible falta de reproductibilidad en los laboratorios por la gran variedad de técnicas utilizadas. Así, Noardhoek (1994), con las mismas muestras enviadas a 10 laboratorios diferentes, obtuvo resultados tan sumamente dispares, que hizo que durante un cierto tiempo se plantearan serias dudas de su utilidad. Hoy en día esas dudas no existen.

Los problemas de sensibilidad (Clarridge 1993) y especificidad varían según la mayor o menor capacidad de extracción del DNA; tal y como dijimos, de las diferentes secuencias dianas utilizadas en las amplificaciones; de los diferentes procedimientos de detección del amplificado, y del mayor o menor número de microorganismos que tenga la muestra. En cualquiera de los casos, hay que tener en cuenta que son frecuentes las contaminaciones (por lo que es necesario colocar una gran cantidad de controles positivos y negativos), y que a veces se puede detectar el genoma en antiguos pacientes tuberculosos o tratados.

Ante el incremento ya comentado en el número de casos de la tuberculosis y las dificultades planteadas en los laboratorios, el CDC de Atlanta, tomando conciencia del problema, recomendó que los resultados diagnósticos se realizaran en un tiempo corto que permitiera el control del proceso. Dichas recomendaciones fueron el conseguir resultados de las tinciones en 24 horas, el aislamiento e identificación en un máximo de 10-14 días, y los estudios de susceptibilidad a drogas en un máximo de 16-30 días (Doern 1996).

Evidentemente, el único resultado que puede ajustarse a lo recomendado por el CDC es el de las tinciones. En el resto, el problema es más complejo. Por ello, nos podríamos hacer tres tipos de preguntas:

* ¿Se consigue obtener un resultado diagnóstico en 10-14 días sin la utilización de la Biología Molecular?. Probablemente, no. En un estudio realizado en 10 laboratorios de USA, sólo dos lo consiguieron.

* ¿Permite la PCR conseguirlo? Posiblemente sí, al menos en ciertas muestras.

* ¿Cuándo se debería aplicar en rutina clínica? Aquí, la respuesta es más difícil, dependiendo de tres factores fundamentales: la existencia de una infraestructura adecuada en relación al espacio, de una infraestructura en relación al personal y, sobre todo, de la solución de los problemas económicos que lleva consigo. Evidentemente no debe de hacerse de forma sistemática, sino sólo en determinados casos tales como formas paucibacilares en las que el número de bacilos es muy pequeño, tuberculosis miliares o pleurales, meningitis, infecciones diseminadas, primoinfecciones en niños tuberculosos, articulares, dérmicas, etc. Es decir, en aquellos casos en los cuales el diagnóstico clásico sea más difícil, bien por el bajo número de microorganismos bien dificultades específicas.

Aún cuando la localización más frecuente sigue siendo la tuberculosis pulmonar, no debemos olvidar que podemos buscar el *Mycobacterium* por técnicas de Biología Molecular en otros sitios, tales como sangre, LCR, heces, (Li 1996) lesiones dérmicas, articulares, orina, o incluso algunas procedencias menos frecuentes como jugo gástrico (Fusegawa 1995), intestinal, médula ósea (Lombard

1994) o endometrio (Hasimoto 1994). De todas ellas, las más frecuentes son a partir de hemocultivo o LCR.

A partir del hemocultivo, según alguna de las publicaciones más recientes (Kulski 1995,1996; Condos 1996), se obtienen buenos resultados, haciéndolo tanto de forma directa como en células mononucleares de sangre periférica (PMBC). De hecho, en nuestro país, Folgueira (1996) obtiene mejores resultados con PMBC, recomendándolo en tuberculosis diseminadas y extrapulmonares. Es extremadamente útil en el caso de individuos VIH +, con porcentajes cercanos al 100%.

En meningitis, en términos generales (Donald 1993, Monteyne 1995, Lin 1995) es muy útil. Debido a la posible baja sensibilidad por la existencia de pocas bacterias, la mayoría de los autores recomienda una Nested PCR, obteniéndose positivities que oscilan entre el 70 y el 100% de los casos. En el caso de las Meningitis es donde se tiene una mayor experiencia en su seguimiento tras tratamiento, pensándose, durante un tiempo, que se podría utilizar como marcador de evolución del mismo. Ahora podemos decir que, en general, no sirve como control del tratamiento, ya que sólo se negativiza a partir de las 30 semanas de comenzado, después incluso de la negativización del cultivo. Lo que si parece cierto, es que el mantenimiento de su positividad es índice de mal pronóstico y, de hecho, los enfermos VIH + citados por Scarpellni (1995) que no negativizaron, murieron de forma temprana.

4.- Nuestra experiencia en procesos extra-respiratorios

Tuberculosis articular. Para establecer el diagnóstico de Tuberculosis osteoarticular, aparte de la presunción clínica y la radiología indicativa, hemos de tener en cuenta que la población bacteriana es a veces escasa y el tiempo de cultivo puede ser mayor aún que en el de otros órganos, por lo que PCR puede ayudar a solucionar algunos procesos. Les presentamos un caso estudiado en nuestro Departamento (Quirós 1995), en el que utilizamos la técnica de Altamirano (1992), con primers derivados de un único fragmento de DNA de 318 pares de bases capaces de amplificar, a partir de un posible y único ácido nucléico problema, un número indeterminado de veces dicho ácido nucléico, si es que existiese. El sistema de detección se basó en la utilización de una sonda conocida, unida a una placa marcada con estreptavidina biotina a la que se hibridaría el DNA buscado, que, a su vez, se visualizaría mediante la utilización de anticuerpos anti-DNA marcados con un enzima. La enferma presentaba una clínica y lesiones sugestivas en cabeza femoral, con cultivo y tinción negativos tanto en esputo como en hueso, pero una PCR positiva a partir de sinovia que más tarde se confirmó con el cultivo. Hemos ganado varios días en el diagnóstico.

Por último, les vamos a presentar algunos casos de la utilización de PCR en lesiones dérmicas porque, aunque evidentemente ya no vemos lesiones tuberculosas muy llamativas, si está siendo necesario diagnosticar casos en los que a veces la etiología tuberculosa debe ser tomada en cuenta, sobre todo en individuos inmunodeprimidos, para la instauración de un rápido tratamiento.

En un trabajo de nuestro Departamento en colaboración con la Dra Quirós y el Instituto per la Biotecnologia de Italia (Quirós, 1995) en el que estudiamos biopsias de pacientes con diferentes lesiones dérmicas de posible etiología tuberculosa (lupus vulgar en nariz y en pierna, nódulos ulcerativos, liquen

escrofulosa, lesiones eritematosas, lesiones vegetantes, etc.), encontramos un 30% de positividad con la tinción, lo que nos confirmaba nuevamente su baja sensibilidad, un 60% con el cultivo, y un 85% con PCR.

De las biopsias positivas, el 35% fueron cultivo y tinción positivas, otro 35% fue sólo cultivo positivo y, lo que es más importante, un 29% de ellos fueron cultivo y tinción negativos. Es decir, no sólo habíamos hecho un diagnóstico más rápido, sino que habíamos recuperado un porcentaje importante. Como ya hemos comentado que uno de los problemas de las técnicas de amplificación génica son los falsos positivos y para evitar errores tras la amplificación, se sometieron las muestras a un Southern blot con varios controles positivos y negativos. Queremos asimismo resaltar que todas las muestras negativas para PCR fueron asimismo negativas en cultivo y en tinción.

Igualmente hemos estudiado un grupo de pacientes (Quirós, 1997) con lesiones de posible etiología tuberculosa cuya biopsia demostró la existencia de "tuberculides", lesiones necróticas con inflamación granulomatosa. Todos los pacientes fueron fuertemente positivos en la intradermorreacción de Mendel Mantoux con más de 20 mm, la tinción y el cultivo fueron negativos, pero la PCR fue positiva en un 85% de los casos. Hasta ahora, el hecho de la ausencia de aislamiento de las Mycobacterias había puesto en discusión la posible etiología tuberculosa de las tuberculides, achacándose las intensas respuestas en las intradermorreacciones a procesos de hipersensibilidad frente a antígenos o a diseminaciones hematógenas. La detección del DNA en las tuberculides sugiere no sólo la posibilidad de la existencia de fragmentos bacterianos o antígenos, sino de bacterias intactas.

La Tuberculosis, que afectó como ya sabemos de forma implacable el siglo XIX, reapareció como el dios Jano, bifronte, con dos caras: una como representación del desarrollo industrial, de la pobreza, del hacinamiento, y otra como exacerbación del espíritu de la época, del Romanticismo. Posteriormente sufrió algunas variaciones, pero, a partir de 1950, su incremento ha sido prácticamente constante. Según la OMS, cuando lleguemos al año 2000 podremos tener más de 3 millones de muertos, muertos que seguirían incrementándose en una curva imparable hasta los 4 ó 5 millones en el 2050. Por supuesto, sino hacemos nada o hacemos poco por su control.

En el siglo pasado tuberculosa murió Margarita Gautier, la Dama de las Camelias de Dumas y la Mimi de la Bohème; tuberculoso murió Modigliani, el pintor de las carnes delicuescentes, de los seres señalados por la muerte prematura, de las mujeres de cuello largo y desvaído, estilizado como los de las vírgenes de Parmigiano, de las mujeres alargadas y dobladas como flores azotadas por el viento de la vida. Tuberculoso murió Chopin, que manchando de rojo las teclas del piano de Valdemosa, representó la quintaescencia del Romanticismo. En el cuadro del músico que figura pintado por Delacroix en el Museo del Louvre se vislumbran claramente los aspectos tormentosos y dramáticos de su enfermedad, y de su posición de rebeldía ante una sociedad que rechazaba la tuberculosis hasta el punto de hacer exclamar a los campesinos de Mallorca "Este tísico irá al infierno: primero, porque es tísico, y después porque no se confiesa". Es decir, que para entrar en el infierno, tenía más valor ser tuberculoso que pecador.

En nuestra sociedad actual, altamente tecnificada y económicamente fuerte, nuestros pacientes, preferentemente los enfermos VIH no se mueren por tuberculosis, pero sí con tuberculosis. Esta coinfección Tuberculosis/SIDA ha hecho

circular en los medios científicos-literarios, una frase que se adapta a este hecho: en el momento actual, Margarita Gautier y la dulce Mimi de la Bohème, "habrían muerto de SIDA con tuberculosis". El Romanticismo como triste y bella forma de vivir ha desaparecido dando lugar a, como decíamos al principio, los movimientos poblacionales, la drogadicción y toda una serie de factores que siguen propiciando el desarrollo de las enfermedades infecciosas.

Excmos. Sres. Presidentes, Ilmos. Señores Académicos, Sras, Sres. según el poeta Rainer Maria Rilke, la infancia es la patria del hombre. Creo que es verdad, pero también creo que luego esa patria y el desarrollo del hombre la marcan los amigos y el trabajo.

No hables mucho ni abarques muchos asuntos, decía Marco Aurelio. Por ello, no quiero robarles más tiempo, ni con mis palabras, ni con mis trabajos. Quiero acabar como empecé, con mi agradecimiento a mis amigos veterinarios y a esta Corporación, porque han permitido que hoy sea un día que siempre recordaré.

Wordsworth, el poeta inglés, en su maravillosa poesía "Atisbos de inmortalidad" dice exactamente lo siguiente:

* Pues aunque el esplendor tan encendido antaño se quite para siempre de mi vista

* Aunque nada pudiera devolvérme las horas de luces en la hierba y de gloria en la flor

* No habré de entristecerme, y hallaré fuerzas en lo que aún queda

* En aquella primera simpatía, que, habiendo sido, durará ya siempre

* En aquellos pensares tranquilos que brotaron de humanas cuitas

- * En la fe que traspasa las lindes de la muerte
- * En los años que traen la mente reflexiva.

Si yo fuera poeta, debería añadir que además de esa primera simpatía, aquellos pensamientos tranquilos, esa fe en la humanidad y en el más allá y esos años que aportan madurez, la existencia de este día, y de todos ustedes que me han acompañado, mis amigos, han llenado un poco más, como decía Wordsworth, mi pequeño vaso de inmortalidad.

Muchas gracias.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Altamirano M, Kelly M, Wong A, Besville E, Black W, Smith J.
Characterization of a DNA probe for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by Polymerase Chain Reaction.
J Clin Microb 1992,30:2173-2176.
- 2.- An Q, Buxton D, Hendricks A, Robinson L, Shah J, Lu L, Vera- García M, King W, Olive M.
Comparison of amplified QB-Replicase and PCR assays for detection of Mycobacterium tuberculosis
J Clin Microb 1995,33:860-867.
- 3.- Boletín Epidemiológico Semanal
1996,4,19:153-160.
- 4.- Billo Nills
Situación actual de la tuberculosis
Conferencia Internacional sobre Tuberculosis. 1996. Abstract.
- 5.- CDC. Tuberculosis among foreign-born persons entering the United States.
MMWR. 1990,39,39, NO RR-18
- 6.- CDC. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance.
MMWR. 1993,42,42,NO RR-7.
- 7.- CDC. Prevention and Control of Tuberculosis in correctional facilities.
MMWR. 1996,45,NO RR-8.
- 8.- Clarridge J, Shewar R, Shinnick T, Plikaytis B.
Large-scale use of Polymerase Chain Reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine Mycobacteriology laboratory.
J Clin Microbiol 1993,31:2049-2056.
- 9.- Condos R, Mc Clune A, Rom W, Schluger N.

Peripheral blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis.

Lancet 1996,347:1082-1085.

- 10.- D'Amato R, Wallman L, Hochstein L, Colanino P, Scardamaglia M, Ardila E, Chouvi M, Kim K, Patel C, Miller A.

Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche Amplicor Mycobacterium tuberculosis PCR test.

J Clin Microbiology 1995,33:1832-1834.

- 11.- Denniston M, Bird B, Kelley K

Contrast of survey results between state and a cohort of non state mycobacteriology laboratories. Changes in laboratory practices.

J Clin Microb 1997,32,2:422-426.

- 12.- Doern G.

Diagnostic mycobacteriology: where are we today?

J Clin Microb 1996,34,1873-1876.

- 13.- Donald P, Victor T, Jordaan A, Schoeman J, Van Helden P.

Polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculous meningitis.

Scand J Infect Dis 1993,25:613-617.

- 14.- Driver C.

Tuberculosis en la ciudad de Nueva York.

Conferencia Internacional sobre Tuberculosis. 1996. Abstrad 1-12.

- 15.- Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Aguado J, Noriega A.

Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis bacteremia by PCR.

J Clin Microb 1996,34:512-515.

- 16.- Fusegawa H, Miyachi H, Ohshima T, Satoh T, Ohta S, Fujita K, Ando Y.

Detection of mycobacterial DNA from pleural fluid and gastric juice: the comparison of IS6110 gene with Amplicor mycobacterium.

Rinsho By Ari 1995,43:941-947.

17.- Grupo de estudio de Tuberculosis Resistente de Madrid.

Estudio transversal multihospitalario de tuberculosis y resistencias en Madrid (octubre 1993-abril 1994).

Med Clin 1996,106:1-16.

18.- Hashimoto A, Koga H, Kohno S, Miyazaki Y, Taiva K, Tomono K, Kaku M, Hara K.

A case of endometrial tuberculosis diagnosed by polymerase chain reaction.

Kekkaku 1994,69:27-30.

19.- Hill C.

An index to DNA base compositions of bacterial species.

J Gen Microbiol 1996,44:419-437.

20.- Huebner R, Good R, Tokars J.

Current practices in mycobacteriology: results of a survey of state public health laboratories.

J Clin Microb 1993,31:771-775.

21.- Iovannisci D, Winn-Déen E.

Ligation amplification and fluorescence detection of Mycobacterium tuberculosis DNA.

Mol Cell Probes 1993,7:35-47.

22.- Kiehn T, Cammarate R.

Laboratory diagnosis of mycobacterial infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome.

J Clin Microb 1986, 24:708-711.

23.- Kiehn T, Edwards F.

Rapid identification using a specific DNA probe of Mycobacterium avium complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome.

J Clin Microb 1987,25:1551-1552.

24.- Kindelan J M.

Profilaxis de la enfermedad tuberculosa asociada a la infección por VIH.
Conferencia Internacional sobre el síndrome de Inmunodeficiencia adquirida.
1997, Abstract 28-30.

25.- Kulski J, Pryce T.

Preparation of Mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection.

J Clin Microb 1996,34:1985-1991.

26.- Kulski J, Khinsoe C, Pryce T, Christiansen K.

Use of a multiplex PCR to detect and identify Mycobacterium avium and M intracellulare in blood culture fluids of AIDS patients.

J Clin Microb 1994,75:65-69.

27.- Li Z, Han G, Fordham C, Marino P, Brennan M, Gine N, Morris S.

Rapid selection of Mycobacterium avium in stool samples from AIDS patients by immunomagnetic PCR.

J Clin Microb 1996,34:1903-1907.

28.- Lin J, Harn H.

Application of the polymerase chain reaction to monitor Mycobacterium tuberculosis DNA in the CSF of patients with tuberculous meningitis after antibiotic treatment.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 1995,59:175-177.

29.- Lombard E, Victor T, Jordaan A, Van Helden P.

The detection of Mycobacterium tuberculosis in bone marrow aspirate.

Tuber Lung Dis 1994,75:65-59.

30.- López Ruz, M.A.

Coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana y enfermedad tuberculosa en nuestra área geográfica.

1997. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

31.- Montero G, Zanaro A, Albertini A, Bertolo P, Primi D.

DNA enzyme immunoassay general method for detecting products of polymerase chain reaction.

Clin Chem 1991,37:2173-2176.

32.- Monteyne P, Sindic C.

The diagnosis of tuberculous meningitis.

Acta Neurol Bel 1995,95:80-87.

33.- Noordhoek G, Kolk A, Bjune G, Catty D, Dale J, Fine P, Godfrey P, Cho S, Shinsnick T, Sveson S, Wilson S, Van Embden J.

Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories.

J Clin Microb 1994,32:277-284.

34.- Otal I, Samper S, Asensio P, Vitoria A, Rubio C, Gómez Lus R, Martín C.

Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from Bactec cultures.

J Clin Microb 1997, 35:273-277.

35.- Patel R, Kvach T, Mounts P.

Insolation and restriction endonuclease analysis of *Mycobacterial* DNA.

J Gen Microbiol 1986,132:541-551.

36.- Pfyffer G, Kissling P, Kahn E, Welscher H, Salfinger M, Weber R.

Mycobacterium tuberculosis direct test with cerebrospinal fluid, other non respiratory and respiratory specimens.

J Clin Microb 1996,34:834-841.

37.- Quirós E, González I, Bettinardi A, Quirós A, Maroto MC, Piédrola G.

Demostración de tuberculosis articular por PCR e hibridación a partir de membrana sinovial.

Enf Inf Microb Clin 1995,13,633.

38.- Quirós E, Maroto MC, Bettinardi A, González I, Piédrola G.

Diagnosis of cutaneous tuberculosis in biopsy specimens by PCR and southern blotting.

J Clin Pathol 1996,49,889-891.

39.- Quirós E, Maroto Mc, Bettinardi A, Quirós A, Piédrola G.

Detection of mycobacterial DNA in populonecrotic tuberculid lesions by polymerase chain reaction.

J Clin Pathol (in press).

40.- Salfinger M.

Role of the laboratory in evaluating patients with Mycobacterial disease.

Clin Microb Newslet 1995,17,14:108-113.

41.- Sauret J.

Situación actual de la tuberculosis en España.

Conferencia Internacional sobre Tuberculosis. 1996.

Abstract:2-5.30

42.- Scarpellini P, Racca G, Cinque P, Delfanti F, Gianotti N, Terreni M, Vago L, Lazzarin A.

Nested polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring treatment response in AIDS patients with tuberculous meningitis.

AIDS 1995,9:895-900.

43.- Shinnick J, Good R.

Diagnostic Mycobacteriology laboratory practices. CID. 1995,21:291-299.

44.- Stager C, Libonati J, Siddigi S, David J, Hooper N, Batier J, Carter M.

- Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification.
J Clin Microb 1991,29:154-157.
- 45.- Taylor T, Patterson C, Hale Y, Safranek W.
Routine use of PCR. Restriction fragment length polymorphism analysis for identification of Mycobacteria growing in liquid media.
J Clin Microb 1997,35:78-83.
- 46.- Telenti A.
Futuro de la Biología Molecular en Tuberculosis.
Conferencia Internacional sobre Tuberculosis. 1996, Abstract:14-16.
- 47.- Walker G, Nadean J, Spears P, Schram J, Nyez C, Shank D.
Multiplex strand displacement amplification (SDA) and detection of DNA sequences from Mycobacterium tuberculosis and other Mycobacteria.
Nucleic Acids Res 1994,22:2670-2677.
- 48.- Weekly.
Epidemiological Report. Tuberculosis. 1996,71:281-288.
- 49.- Wilkinson R, Haslov K, Rappuoli R, Giovanni F, Narayanan P, Desal C, Vordermeier H, Paulsen J, Pasvol G, Ivany J, Singh M.
Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis as a potential immunodiagnostic reagent.
J Clin Microb 1997,35:553-557.