



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

ESPECIALIZACION EN MEDICINA INTERNA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN

Comparación de dos métodos moleculares (Xpert MTB/RIF y TIB MOL BIOL) en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en un hospital de tercer nivel

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

P R E S E N T A

Dr. Valente de Jesús Jaramillo Rocha

Tutor de tesis:

Dra. Miriam Bobadilla Del Valle

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Asesores:

Dr. Pedro Torres González

Dr. José Sifuentes Osornio

Laboratorio de Microbiología Clínica

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

México D.F.

Noviembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Sergio Ponce de León Rosales

Director de Enseñanza

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. Miriam Bobadilla Del Valle

Tutor de Tesis

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Alfonso Gullias Herrero

Profesor Titular del Curso

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haber creído siempre en mí.

A mi novia por la paciencia y el amor brindado.

*Al Dr. Pedro Torres González y a la Dra. Miriam Bobadilla del Valle por la asesoría
y la confianza.*

INDICE

1.-Introducción.....	8
2.-Marco teórico.....	9
2.1.- Historia de la tuberculosis.....	9
2.2.- Microbiología de <i>M. tuberculosis</i>.....	11
2.3.- Epidemiología de la tuberculosis en el Mundo.....	12
2.4.- Epidemiología de la tuberculosis en México.....	13
2.5.- Tuberculosis extrapulmonar.....	14
3.-Métodos diagnósticos.....	15
3.1.- Tinción ácido-alcohol resistente.....	15
3.2.- Cultivo.....	16
3.3- Pruebas de amplificación de ácidos de nucleicos.....	17
4.-Xpert MTB/RIF y tuberculosis extrapulmonar.....	20
5.- Antecedentes particulares del proyecto.....	22
6.- Definición del problema.....	24
7.-Justificación.....	25
8.- Hipótesis.....	26

9.-Objetivos del estudio.....	26
9.1.- Objetivo general.....	26
9.2.- Objetivos específicos.....	26
10.-Método.....	28
10.1.- Diseño del estudio.....	28
10.2.- Población.....	28
10.3.- Variables.....	29
10.4 Análisis estadístico.....	30
11.-Metodología de laboratorio.....	31
11.1.- Proceso de digestión y descontaminación de la muestra (a excepción de muestras de LCR)	31
11.2.- Cultivo.....	31
11.3- Identificación del CMTB.....	32
11.4.- Amplificación de ácidos nucleicos (TIB MOLBIOL).....	32
11.5.- Amplificación de ácidos nucleicos (XPRT MTB/RIF).....	32
12.-Resultados.....	33
13.-Discusión.....	35
14.-Conclusiones.....	38

15.- Tablas y figuras.....	39
Figura1. Países en los que se agrupa el 89% de los casos de TB en el mundo....	39
Figura 2. Incidencia estimada de TB por la OMS, 1990-2011.....	39
Figura 3. Comorbilidades asociadas a la aparición de TB (porcentaje).....	40
Figura 4. Incidencia de la TB en México, 1990-2010.....	40
Figura 5. Mortalidad causada por TB en México, 1990-2010.....	41
Tabla 1. Resultados de la distribución del tipo de muestras analizadas.....	42
Tabla 2. Resultados de las características demográficas de los pacientes.....	43
Tabla 3. Resultados de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH.....	44
Tabla 4. Resultados de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección.....	45
Tabla 5. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección y su relación con el resultado del cultivo.....	46
Tabla 6. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección y su relación con el resultado de la prueba Xpert MTB/RIF.....	47
Tabla 7. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección y su relación con el resultado de la prueba TIB MOLBIOL.....	48
Tabla 8. Resultados de las Características demográficas de los pacientes y su relación con el resultado del cultivo.....	49

Tabla 9. Resultados de las características demográficas de los pacientes y su relación con el resultado de la prueba Xpert MTB/RIF.....	50
Tabla 10. Resultados de las características demográficas de los pacientes y su relación con el resultado de la prueba TIB MOLBIOL.....	51
Tabla 11. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH y su relación con el resultado del cultivo.....	52
Tabla 12. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH y su relación con el resultado de la prueba Xpert MTB/RIF.....	53
Tabla 13. Resultados del análisis de las características de los pacientes con infección por VIH y su relación con el resultado de la prueba TIB MOLBIOL.....	54
Tabla 14. Resultado de la determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas Xpert MTB/RIF y TIBMOLBIOL por tipo de muestra.....	55
Tabla 15 Tabla 15. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes y el resultado positivo de todas las pruebas diagnósticas utilizadas en el estudio.....	56
16.-Bibliografía.....	57

1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por microorganismos del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), la cual da lugar a un amplio espectro de manifestaciones clínicas. En la actualidad, se considera a la TB la segunda causa de muerte debida a un agente infeccioso único (1). En el año 1993 la Organización Mundial para la Salud (OMS) declaró a la TB una emergencia global y de manera posterior desarrolló la estrategia “tratamiento acortado estrictamente supervisado” (DOTS por sus siglas en inglés) (50, 51). Lo anterior con la finalidad de lograr para el año 2000 la cura del 85% de los casos detectados mediante tinción Ziehl-Neelsen (ZN) (52).

Las metas fijadas para el año 2000 no pudieron ser logradas, por lo que la OMS estableció el año 2015 como el nuevo plazo para lograr el objetivo de disminuir la incidencia y el número de muertes causadas por la TB (53).

En 2011 se registraron 8.7 millones de nuevos casos de TB en el mundo, de los cuales 1.1 millones corresponden a personas coinfectadas con VIH; además ese mismo año se reportaron 1.4 millones de muertes debido a esta enfermedad (0.9 millones de personas VIH-negativas y 0.43 millones de personas VIH-positivas) (2).

Se considera que el 89% de los casos de TB diagnosticados en el mundo se agrupan en 96 países entre los cuales se incluye México (2).

En México entre los años 2000-2010 se reportaron 192,211 casos nuevos de TB, de los que 167,566 (85%) correspondieron a TB pulmonar (TBP) (3). En este mismo período se registraron 29,645 (15%) casos de TB extrapulmonar (TBE), las localizaciones más frecuentes fueron ganglionar (4.7%), seguida por TB miliar (1.5%), renal (1.5%), meníngea (1.2%), intestinal (1.0%) y ósea (0.9%) (4).

La OMS considera un caso definitivo de TB, cuando se demuestra la presencia de *M. tuberculosis* en un espécimen clínico mediante baciloscopia, cultivo o método molecular (4). En 2011, la OMS avaló el uso del sistema Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de TB en muestras de expectoración tanto de adultos como niños; sin

embargo la utilidad de este ensayo en el diagnóstico de TB extrapulmonar aún no se conoce (6).

2. Marco teórico

2.1 Historia de la tuberculosis

La evidencia de la existencia de la tuberculosis se remonta hasta las antiguas civilizaciones, los escritos de Herodoto, hacen alusión de como los soldados del ejército de Xerxes abandonaron los campos de batalla de los espartanos debido a la consunción (55).

Hipócrates fue el primero en describir las características de la enfermedad, como fiebre, expectoración espesa y pérdida del apetito; sin embargo tenía la creencia de que se trataba de un padecimiento hereditario (56).

Es hasta los siglos XVII y XVIII durante la revolución industrial, que las condiciones de hacinamiento en las que vivía la mayoría de la población permitieron una diseminación más rápida de la enfermedad, lo que provocó que en esa época una cuarta parte de todas las muertes en Europa y Nueva York fueran ocasionadas por la TB (1)(13).

El 24 de marzo de 1882 Robert Koch presentó sus descubrimientos y demostró el origen infeccioso de la TB ante la Sociedad de Fisiología de Berlín, al poco tiempo publicó en el Berliner Klinische Wochenschrif lo siguiente: “En el futuro la lucha contra esta terrible plaga de la humanidad ya no será contra algo desconocido, sino con un parásito tangible, cuyas condiciones de vida son ya conocidas y pueden investigarse aún más” (13),

A pesar del reconocimiento del agente infeccioso causante de la TB, la aparición de un tratamiento efectivo para el mismo no fue posible hasta el año 1943, cuando en el laboratorio de Selman Waksman en la Universidad de Rutgers se logró el aislamiento de la estreptomycinina a partir de *Streptomyces griseus*, lo que dio la pauta para que en el año 1948 la British Medical Research Council condujera el primer ensayo clínico

controlado a gran escala del uso de un fármaco(13). En ese mismo año dos nuevos fármacos antituberculosos salieron al mercado (tioacetazona y ácido para-aminosalicílico). En 1951 se introdujo la isoniazida como nuevo fármaco para el tratamiento de la TB (14), lo que aumentó de manera considerable la tasa de respuesta al tratamiento. Posterior al desarrollo de la isoniacida se produjeron los siguientes fármacos: pirazinamida (1952), cicloserina (1952), etionamida (1956), rifampicina (1957) y etambutol (1962).

Posterior a la entrada de estos fármacos en el mercado para el tratamiento de la TB, fue evidente el hecho de que el tratamiento con monoterapia producía con rapidez la aparición de cepas resistentes y que el uso de terapia combinada llevaba a la supresión de esta resistencia. Esto llevó al concepto de terapia combinada como el estándar de tratamiento para estos pacientes.

A pesar del tratamiento combinado en el año de 1957, se reportó por primera en el Reino Unido una tasa de resistencia de 1.3% a isoniacida en aislamientos de pacientes con diagnóstico de tuberculosis vírgenes a tratamiento (15), mientras tanto, en los Estados Unidos se reportó una resistencia a isoniacida de 9.7% entre los años 1965 y 1968 para pacientes con nuevo diagnóstico de TB sin tratamiento (16). En el año 1969, se reportó por primera vez la presencia de resistencia a rifampicina (17).

Asociado al resurgimiento de la TB, en la década de 1990 comenzó a reportarse la presencia de cepas con resistencia concomitante a isoniazida y rifampicina, con lo que se acuñó el término de tuberculosis multidrogorresistente (MDR-TB). La aparición de estos microorganismos condiciona un problema más para el control de la TB a nivel mundial, ya que el DOTS es menos efectivo en este grupo y el uso de fármacos de segunda línea está asociado a una mayor toxicidad (52 las bibliografías de la 52).

Las bases moleculares de la resistencia a la isoniazida y rifampicina son diferentes. La resistencia a isoniazida se debe a la mutación en al menos uno de los genes *katG* o *inhA*, a diferencia de la resistencia a rifampicina que casi siempre se debe a mutaciones en el gen *rpoB*. Las mutaciones que ocasionan resistencia a rifampicina e

isoniazida no están relacionadas entre sí, por lo que se requieren mutaciones separadas para que un microorganismo pase de ser susceptible a MDR-TB.

Actualmente, se puede detectar la mutación del gen *rpoB* mediante la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). La resistencia a rifampicina es un marcador de MDR-TB en más del 90% de las veces, debido a que < de 10% de los microorganismos son monorresistentes a rifampicina (51, 57).

2.2 Microbiología de *M. tuberculosis*

El CMTB pertenece a la orden Actinomycetales, familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium*. El CMTB comprende siete especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinepedii* y *M. microti*. Se ha postulado que un ancestro común de todas las especies que forman el CMTB surgió en África, se sometió a diversificación temprana en esa misma región y de manera posterior las olas de migraciones humanas fuera de África permitieron la expansión clonal de las diversas especies en el resto del mundo (19). Se cree que el proceso evolutivo del CMTB comenzó hace 3 millones de años. Aunque los miembros del CMTB muestran diferentes características fenotípicas, representan uno de los mejores ejemplos de homogeneidad genética, con una variación de solamente 0.01% a 0.03% de nucleótidos y ninguna huella significativa de intercambio genético con otras bacterias (19). Cada una de estas especies tiene hospederos diferentes. *M. tuberculosis* causa TB en humanos, *M. bovis* en el ganado, *M. africanum* en humanos de la región tropical de África y *M. microti* en roedores (60).

Las micobacterias del CMTB, son bacilos aerobios, intracelulares, inmóviles, no esporulados, con un tamaño de 0.2 x 1 a 10 μm , su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, su tiempo de replicación es de 18-20 horas y tiene una pared celular cuya estructura se caracteriza por la presencia dominante de ácidos micólicos (60 - 90 átomos de carbono) y una amplia gama de lípidos. Esta envoltura lipídica le confiere una superficie hidrofóbica que la hace resistente a la mayoría de las tinciones, siendo posible teñirse sólo con la tinción de ZN (60). Los seres humanos son el único reservorio para la especie *M. tuberculosis*.

2.3 Epidemiología de la tuberculosis en el Mundo

La incidencia de la TB no puede ser medida de manera directa debido a que se requerirían estudios a largo plazo en grandes cohortes, lo que generaría un alto costo (2). Es por esto que la incidencia de la TB solo puede estimarse mediante las herramientas específicamente diseñadas por la OMS. Estas herramientas están basadas en los reportes de 96 países en los que se encuentra el 89% de los todos los casos de TB del mundo (Fig. 1). Para los países que no están incluidos en estas herramientas, las estimaciones se basan en la extrapolación de series antiguas o actualizaciones utilizando datos de mortalidad de los sistemas de registro.

Mediante estas herramientas para el año 2011 se estimó una incidencia de 8.7 millones de casos de TB en todo el mundo, los cuales se localizaron de la siguiente forma: Asia (59%), África (26%), Mediterráneo Oriental (7.7%), Europa (4,3%) y América (3%). De los 8.7 millones de casos nuevos en el 2011; 1.1 millones (13%) correspondieron a personas coinfectadas con VIH. La proporción de casos de TB coinfectados con VIH es mayor en los países de África; en general en esta región se estima que el 39% de los casos de TB tienen VIH de manera concomitante.

A nivel mundial, la incidencia de la TB se mantuvo estable desde 1990 hasta alrededor de 2001 y luego comenzó a disminuir. Entre 2010 y 2011, la tasa de disminución fue 2.2%. La tasa de incidencia está disminuyendo en las seis regiones de la OMS. La tasa de disminución entre 2010 y 2011 fue de 0.5% en el Mediterráneo Oriental; 2.0% en el sureste de Asia; 2.3% en el Pacífico occidental; 3.1% en África; 3.8% en América y 8.5% al año en la Unión Europea (Fig. 2).

Actualmente, la presencia de cepas MDR-TB supone un nuevo riesgo de salud mundial del cual solo puede estimarse la prevalencia, que para el año 2011 se calculó en 0.63 millones de casos nuevos; sin embargo no es posible a la fecha estimar la tendencia de esta prevalencia.

La prevalencia de la TB se puede medir directamente mediante las encuestas poblacionales de los diferentes países. Se calculó en el año 2011 que la prevalencia de

la TB es de 12 millones, con una disminución de la misma de un 36% de manera global desde 1990.

Nuevamente en el año 2011, se estimó una mortalidad de 0.99 millones, además se estimó un aproximado de 0.43 millones de muertes debido a TB en personas coinfectadas con VIH, con lo que el total de muertes atribuidas a la TB es de 1.4 millones.

A nivel mundial, las tasas de mortalidad (excluyendo las muertes entre las personas VIH-positivas) se han reducido en un 41% desde 1990, y esta reducción de la mortalidad se ha registrado en las seis regiones de la OMS.

2.4 Epidemiología de la tuberculosis en México

El panorama de la tuberculosis en México ha cambiado en los últimos años, de acuerdo a la información contenida en el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), en el período comprendido del año 2000 a 2010 se registraron 197,211 casos nuevos de TB, de los cuales 167,566 (15%) correspondieron a la forma pulmonar de la enfermedad(4).

En el año 2011 se reportaron en México 2,414 defunciones debido a la TB, de las que 2116 (87.7%) correspondieron a TB pulmonar.

Es importante resaltar que en México las principales enfermedades relacionadas con la presencia de TB son diabetes y desnutrición (Fig. 3).

En México al igual que en el resto del mundo la incidencia de la TB se encuentra en descenso, según las cifras oficiales, desde el año 1997 hasta el año 2011 la reducción de la incidencia ha sido de un 28.8% (Fig. 4).

En lo que respecta a la mortalidad en México también se ha encontrado una marcada reducción, que de acuerdo a la Secretaría de Salud se estima en un 73% desde el año de 1990 hasta el año 2011(Fig. 5).

En México desde el año 2000 se ha reportado la presencia de MDR-TB, para el año 2011 la incidencia de la misma fue de 152 casos y su prevalencia de 395 casos. Es importante mencionar que nuevamente la diabetes y desnutrición son las enfermedades que con más frecuencia se asocian a la presencia de MDR-TB.

2.5 Tuberculosis extrapulmonar

La presentación y manifestaciones clínicas de la TB dependen del sitio anatómico afectado. De acuerdo a los datos del SUIVE en el período de 2000 a 2010 de los 197,211 casos de TB la localización extrapulmonar más frecuente fue la ganglionar (4.7%), seguida por TB miliar (1.5%), renal (1.5%), meníngea (1.2%), intestinal (1.0%) y ósea (0.9%) (4).

El diagnóstico de la TBE en ausencia de afección pulmonar presenta dificultades clínicas y técnicas importantes, debido a que con frecuencia las manifestaciones clínicas son inespecíficas (linfadenopatía crónica, derrame pleural, ascitis, osteomielitis vertebral o piuria estéril) (26). Por otro lado, con frecuencia es necesario el empleo de métodos invasivos para la obtención de muestras biológicas que permitan el diagnóstico microbiológico. La carga bacilar en la mayoría de los casos de tuberculosis extrapulmonar (TBE) es menor que en los casos de TBP, lo cual disminuye la probabilidad de observar por tinción de ZN a los microorganismos, así como el rendimiento diagnóstico del cultivo.

Es por ello que los estándares internacionales para el diagnóstico y tratamiento de tuberculosis, indican que en todo paciente con sospecha de TBE se debe coleccionar una muestra adecuada para microscopía, cultivo y estudio histopatológico, lo anterior debido a que solamente 5 a 10% de las muestras son positivas para tinción de ZN (11).

En algunos casos, es necesario iniciar el tratamiento antibiótico de manera empírica, mientras se esperan los resultados del cultivo.

Una de las manifestaciones más graves de la TB es la afección del sistema nervioso central, la cual se presenta en la mayoría de los casos como meningitis y con menor frecuencia como tuberculomas o abscesos cerebrales (23). La meningitis

tuberculosa presenta características clínicas similares a otras neuroinfecciones; sin embargo, esta infección tiene predilección por localizarse en la porción basal de las meninges, y son frecuentes las complicaciones vasculares en esta área (vasculitis del polígono de Willis o de la circulación vertebrobasilar). Otra complicación frecuente es la obstrucción del flujo del LCR y como consecuencia hidrocefalia. La mortalidad de la TB meníngea (TBM) es de 15 a 60% y hasta 30% de los pacientes que sobreviven a la infección presentan secuelas neurológicas graves (23). El diagnóstico y tratamiento tempranos son fundamentales, debido a que el inicio tardío del tratamiento es uno de los principales predictores de mortalidad en estos pacientes (24).

3. Métodos diagnósticos

Un amplio grupo de técnicas de laboratorio ha sido desarrollado para el diagnóstico de TB, entre las que se incluye la tinción de ZN, el cultivo de micobacterias y la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT); el primero de ellos posee la ventaja de ser un estudio rápido y barato y su principal inconveniente es la sensibilidad diagnóstica baja (1); con respecto a los cultivos en medios sólidos, poseen la ventaja de permitir la observación de la morfología colonial que es de mucha ayuda para realizar la identificación sobre todo en micobacterias no tuberculosis lamentablemente el crecimiento de las micobacterias es lento y habitualmente los cultivos son de poca utilidad en la decisión del inicio del tratamiento; finalmente la NAAT permite tener resultados el mismo día, tiene una sensibilidad y especificidad superior al de la baciloscopía, sin embargo es una tecnología relativamente cara, que no permite distinguir entre microorganismos viables de no viables.

3.1 Tinción ácido-alcohol resistente

La tinción de Ziehl-Neelsen, se basa en la capacidad de las micobacterias de resistir la decoloración inducida por alcohol-ácido después de haber sido teñido con colorante básico. Esta propiedad se debe a los ácidos micólicos de la pared celular que al ser calentada permite el paso de colorante. Posteriormente, al momento de enfriar la muestra el colorante básico (carbol-fucsina) queda incluido dentro de la pared celular y al ser teñido nuevamente el frotis con colorante de contraste (azul de metileno) los

bacilos se tiñen de color rojo y en el caso de los BAAR del CMTB presentan formación de cordones. Los organismos aparecen como bacilos de 2 a 4 micras de largo y 0.2 a 5 de ancho. Se estima que 5,000 a 10,000 organismos/ml de esputo se requieren para observar un frotis positivo (1). La sensibilidad de la tinción de ZN es de 22% a 60% para muestras de expectoración y de 10% a 91% en muestras en LCR dependiendo del volumen de líquido analizado y el tiempo empleado en su evaluación, sin embargo, la mayoría de las series han reportado valores inferiores al 50% (23, 50, 53, 54).

3.2 Cultivo

El diagnóstico definitivo de la TB se realiza con el cultivo de especímenes clínicos. Las muestras de esputo o tejido requieren de un proceso de digestión y descontaminación de la muestra para inocular los medios de cultivo. Los medios de cultivo para micobacterias son enriquecidos y selectivos, los más utilizados son: medio Löwenstein-Jensen a base de huevo (LJ), agar Middlebrook 7H10 y el caldo Middlebrook 7H9. El crecimiento es más rápido con incubación en atmósfera de 5-10% de CO₂. Los cultivos líquidos requieren de 1 a 3 semanas de incubación para la detección del crecimiento de los bacilos, en comparación con el medio sólido, los cuales requieren de 3 a 8 semanas. Sin embargo, en medios sólidos se puede observar la morfología colonial, la detección de cultivos mixtos, que ocasionalmente pueden sólo crecer en medios sólidos (1).

Los sistemas comerciales automatizados facilitan el cultivo de micobacterias. El monitoreo del crecimiento de las micobacterias es mediante la detección de la producción de CO₂ o el consumo de O₂ a través de indicadores colorimétricos o fluorométricos, uno de los sistemas más usados es el medio MGIT (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD), en el que se detecta el crecimiento en 1 a 3 semanas (6).

Actualmente, se recomienda que todas las muestras con sospecha de TB, sean inoculadas tanto en un medio sólido y en uno líquido, para incrementar la sensibilidad del cultivo. Como se ha mencionado el crecimiento de las micobacterias es lento y por

lo tanto los cultivos para micobacterias resultan de poca utilidad en la toma de decisiones para el inicio de tratamiento sobre todo en pacientes con meningitis que es una infección grave.

3.3 Pruebas de amplificación de ácidos de nucleicos

Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, son métodos para la detección directa de DNA de *M. tuberculosis* en muestras clínicas.

La amplificación de ácidos nucleicos es posible mediante la técnica de reacción de la polimerasa en cadena (PCR), desarrollada en 1983. El método se basa en un ciclo térmico, que consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos que permiten la replicación enzimática de ADN. Los componentes clave son fragmentos cortos de ADN ("primer") junto con una polimerasa de ADN. A medida que el proceso progresa, el ADN generado es en sí mismo utilizado como una plantilla para la replicación, poniendo en marcha una reacción en cadena hasta obtener ADN en forma exponencial.

En la técnica de PCR convencional, para comprobar si se ha generado el fragmento de ADN esperado, se emplea electroforesis en gel de agarosa para la separación por tamaño de los productos de ADN producidos. El tamaño de los fragmentos de ADN se compara con marcadores de peso molecular que se corren en el mismo gel de agarosa.

Actualmente existe el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR), el cual sigue el principio general de la reacción de la polimerasa en cadena; su característica clave es que el ADN amplificado se detecta en tiempo real. Este es un nuevo enfoque en comparación con la PCR estándar, en la que se detecta el producto de la reacción al final. Dos métodos comunes para la detección de productos de PCR-TR son: el uso de compuestos fluorescentes que se intercalan con cualquier secuencia de ADN de cadena doble o el uso de oligonucleótidos marcados con un

compuesto fluorescente que permite la detección sólo después de la hibridación de la sonda con el ADN blanco complementario.

La sensibilidad de la amplificación de ácidos nucleicos está en un punto intermedio entre la tinción de ZN y el cultivo. Para especímenes con baciloscopia positiva, la sensibilidad y la especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos excede el 95%. Para los casos con baciloscopia negativa, la sensibilidad oscila entre 40% a 77% y la especificidad sigue siendo mayor del 95% (8).

La *Food and Drugs Administration* FDA en el año 2010 publicó una actualización de las guías para el uso de amplificación de ácidos nucleicos en el diagnóstico de TB en muestras respiratorias (31). El sistema *The Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test* (MTD, Gen-Probe, San Diego, California) (36) fue aprobado en 1995 para su uso con muestras respiratorias con baciloscopia positiva y en un suplemento posterior en 1999 una prueba MTD mejorada fue aprobada para su uso en muestras respiratorias de pacientes con sospecha de tuberculosis con baciloscopia negativa. Además, el sistema *Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test* (Amplicor, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) fue aprobado por la FDA en 1996 para su uso en muestras respiratorias de pacientes con sospecha de tuberculosis con baciloscopia positiva (35).

Una de las limitantes de ambas pruebas es que la presencia de ciertas sustancias (hemoglobina, heparina, lidocaína entre otras) en las muestras clínicas son inhibitorias de la reacción y ocasionan resultados falsos negativos. Dicho efecto es más pronunciado en muestras no refrigeradas. El sistema MTD detecta este tipo de inhibidores invalidando la muestra, lo que permite disminuir la tasa de falsos negativos (21, 27).

Tanto MTD como Amplicor se basan en la amplificación del elemento de inserción *IS6110*, un elemento de ADN específico del CMTB que permite diferenciar *M. tuberculosis* de otras micobacterias no tuberculosas (37). *IS6110* se encuentra

altamente conservado en el CMTB debido a la ausencia de recombinación genética con otras bacterias a lo largo de su evolución (38).

En 1994 Hunt y colaboradores describieron por primera vez el uso de NAAT para la detección simultánea de MTB y la resistencia a rifampicina utilizando el gen *rpoB* como blanco de amplificación, sin embargo la complejidad del ensayo impidió su uso rutinario, de manera inicial. (39). La ventaja de este nuevo blanco radica en que es 100% específico para MTB y la mutación de la región “hot spot” de 83 pares de bases se encuentra presente en el 95 a 98% de las cepas que muestran resistencia a rifampicina (3, 18, 34). Raja y cols., en el año 2005 fueron los primeros en utilizar la plataforma GeneXpert como un novedoso sistema automatizado de NAAT que permite el procesamiento de muestras biológicas con mínima intervención humana y un desempeño equivalente a otras técnicas de PCR (40).

En el año 2009, Helb y colaboradores adaptaron la plataforma automatizada GeneXpert para el diagnóstico de TB, en esta plataforma se utiliza el gen *rpoB* como blanco de amplificación (Xpert MTB/RIF). Ellos probaron 107 muestras de expectoración congeladas provenientes de Uganda y Vietnam, en dicho estudio se reportó la capacidad bactericida del reactivo de la muestra, el límite de detección en UFC de la prueba y la reacción cruzada con otras especies de micobacterias no tuberculosas. Posteriormente, Boehme y colaboradores llevaron a cabo los primeros dos estudios clínicos multicéntricos patrocinados por la *Foundation for Innovative New Diagnostics* (FIND) en los que se evaluó el desempeño del sistema Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA) en muestras respiratorias. El primero de ellos se llevó a cabo en Sudáfrica, Perú, India y Azerbaiyán, en donde se reclutaron 1730 pacientes y se procesaron tres muestras de expectoración de cada uno de ellos. una para cultivo en medio líquido, otra para cultivo en medio sólido y la última se utilizó para la prueba Xpert MTB/RIF; este estudio demostró una sensibilidad (Se) de 98.2% en las muestras con baciloscopia positiva y de 72.5% en las muestras con baciloscopia negativa. El segundo estudio se incluyeron 6648 pacientes en Sudáfrica, Perú, India, Azerbaiyán, Filipinas y Uganda a todos ellos se les realizó cultivo de micobacterias y prueba NAAT

Xpert MTB/RIF, este estudio mostró una Se de 90.3% y 76.9% para muestras respiratorias con baciloscopia positiva y negativa respectivamente (32, 33).

Posterior a la publicación de los estudios de Boehme y cols., la OMS avaló el uso del sistema Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de TBP en adultos y niños (6). En un metanálisis publicado en 2012, el cual incluyó 18 estudios y 10,224 muestras, emplearon el sistema Xpert MTB/RIF, se reportó una sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de 90.4% y 98.4% respectivamente para el diagnóstico de TBP y en el diagnóstico de TBE, Se de 80.4% y Es de 86.1% (9).

Otro metanálisis reciente publicado en 2013, el cual, incluyó 18 estudios en pacientes adultos, demostró una Se y Es de 88% y 98% respectivamente para el diagnóstico de TBP cuando se empleó Xpert MTB/RIF como único método diagnóstico y una Se de 67% y Es de 98% cuando se empleó únicamente en muestras con baciloscopia negativa (10).

Posterior a la validación del sistema Xpert MTB/RIF se comenzaron a publicar estudios comparativos del desempeño diagnóstico de la plataforma Xpert MTB/RIF con otras NAAT basados en amplificación de *IS6110* en muestras pulmonares. En 2011 Scott y cols., compararon la plataforma Xpert MTB/RIF con los sistemas MTBDRplus (Hain Lifescience) y *LightCycler Mycobacterium Detection* (LCTB, Roche) en donde reportaron una Se superior para el sistema Xpert MTB/RIF (Se 86%, 76% y 76 % respectivamente) (48). En 2013 Antonenka y colaboradores informaron una Se de 74.6% para Xpert MTB/RIF y Se de 79.1% para ProbeTec ET DTB (DTB, Becton Dickinson) (49).

4. Xpert MTB/RIF y tuberculosis extrapulmonar

Hasta ahora, han sido pocos los estudios que han evaluado la utilidad de Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. La cantidad de muestras incluidas en dichos estudios es heterogénea, con poblaciones que van de 5 a 1476 muestras, en dichos estudios la Se de la prueba se encontró entre 25 y 96.6%, siendo

en 8 de los 9 estudios superior al 50% (21, 22, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47). La variación de la Se presentada en estos estudios se ha atribuido de manera inicial a las diferencias en las características de las poblaciones en las que se ha evaluado el sistema Xpert MTB/RIF, sin embargo en algunos estudios se ha sugerido que el proceso de descontaminación asociado con el bajo inóculo de las muestras extrapulmonares podría influir de manera negativa en la Se de la prueba. Por otra parte Vadwai y cols., en uno de los estudios más grandes que se han publicado en el uso de Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de TB extrapulmonar ha sugerido realizar centrifugación de la muestra antes del procesamiento de la misma con la finalidad de aumentar el rendimiento diagnóstico (42). En la siguiente tabla se muestra una breve descripción de estos estudios.

	País	Muestras pos.	Muestras neg.	Muestras con resultado pos.	Estándar de referencia	Se de Xpert MTB/RIF (95% IC)	Es de Xpert MTB/RIF (95% IC)
Causse y cols. (21)	España	41	299	Ganglios 16 LCR 6 Líquido pleural 4 Absceso 5	Cultivo (medio sólido o líquido)	95-1% (83-5–99-4)	100% (98-8–100)
Armand y cols. (22)	Francia	37	0	Ganglios 18 Líquido pleural 7 Hueso 6 Absceso 5	Cultivo (medio sólido o líquido)	53-1% (34-7–70-9)	ND
Zeka y cols. (41)	Turquía	48	128	ND	Cultivo (medio sólido o líquido) o cuadro clínico compatible o estudio radiológico o estudio histopatológico	54-2% (40-3–67-4)	100% (97-2–100)
Vadwai y cols. (42)	India	283	250	Biopsias 105 Exudado 98 LCR 1	Constructo diagnóstico de baciloscopia, cultivo, cuadro clínico, radiología e histología.	80-6% (75-5–85-0)	99-6% (97-8–100)
Ligthelm y cols. (43)	Sudáfrica	30	18	Ganglios 30	Imagen histológica compatible con TB + baciloscopia ± cultivo	96-6% (86-6–100)	88-9% (69-6–100)
Moure y cols. (44)	España	108	41	Ganglios 34 Líquido pleural 26 LCR 2	Cultivo (medio sólido o líquido)	58-3% (48-5–67-8)	100% (91-4–100)
Friedrich y cols. (45)	Sudáfrica	20	5	Líquido pleural	Cultivo (medio líquido)	25-0% (8-7–49-1)	100% (47-8–100)
Hilleman y cols. (46)	Alemania	45	450	Biopsias 30 Orina 5 Heceas 2	Cultivo (medio sólido o líquido)	77-3% (60-5–87-1)	98-2% (96-0–98-9)
Tortoli y cols. (47)	Italia	268	1206	Biopsias 94 Exudado 55 LCR 14 Líquido pleural 18	Cultivo (medio sólido o líquido) o estudio radiológico o estudio histopatológico compatible con TB	81-3% (76-2–85-8)	99-8% (99-4–100)

Tabla 1. Resumen de los estudios sobre el desempeño diagnóstico de la prueba Xpert MTB/RIF para TBE.

Los estudios que comparan el desempeño diagnóstico del sistema XpertMTB/RIF con otras plataformas de NAAT basadas en la amplificación de *IS6110* en muestras extrapulmonares muestran resultados contradictorios. En 2011, Causse y cols., (21) informaron una Se de 95% para la Xpert MTB y Se de 78% con la plataforma TaqMan

Cobas en muestras extrapulmonares, mientras que en el mismo año Armand y cols., (22) reportaron una Se mayor (78% vs 53%) de una PCR casera basada en IS6110 al ser comparada con Xpert MTB/RIF en muestras extrapulmonares.

La Organización Mundial para la Salud (OMS) considera un caso definitivo de TB, cuando se demuestra la presencia de *M. tuberculosis* en un espécimen clínico mediante baciloscopia, cultivo o método molecular (5, 11). En 2011, la OMS avaló el uso del sistema Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de TB en muestras de expectoración tanto de adultos como niños (6); sin embargo el uso de este ensayo en el diagnóstico de TBE aún no se ha sido avalado y la evidencia para su uso en este tipo de muestras es escasa.

Otra de las ventajas que presenta el sistema Xpert MTB/RIF sobre el resto de las NAAT es la capacidad de detectar resistencia a rifampicina, la cual coexiste en el 95% de los casos con resistencia a isoniazida. Esto respresenta una importante ventaja sobre todo en los casos de pacientes previamente tratados en los cuales la resistencia a INH y RIF es de 13% a 17% (51, 52).

Por lo todo lo anterior no existen métodos ideales para el diagnóstico de la tuberculosis, ya que cada uno de ellos posee ventajas y limitaciones.

5. Antecedentes particulares del proyecto

En el periodo comprendido de junio de 2012 a febrero del 2013, se realizó la evaluación del sistema XpertMTB/RIF en muestras clínicas extrapulmonares referidas para realización de PCR para TB y cultivo de micobacterias al LMC del INCMNSZ. Para este propósito, además del procesamiento habitual (Tinción ZN, determinación de NAAT por TIB MOLBIOL y cultivo de micobacterias en medio sólido y líquido), se realizó la NAAT mediante XpertMTB/RIF en los casos en que existía muestra clínica disponible. Cabe mencionar que los resultados de la plataforma en evaluación no

fueron reportados, debido a que el significado biológico y el rendimiento diagnóstico de la NAAT por XpertMTB/RIF eran inciertos en el laboratorio.

6. Definición del problema

La TB es frecuente en México y hasta en 20% de las ocasiones se presenta en forma extrapulmonar. Esta presentación se asocia a una mayor mortalidad, en relación con factores del hospedero (edad avanzada, comorbilidades) así como al retraso en el diagnóstico e inicio en el tratamiento. Dentro de las localizaciones extrapulmonares, la tuberculosis del SNC, se considera la forma más grave en la cual, el diagnóstico e inicio de tratamiento temprano, impactan de manera favorable en el pronóstico del paciente. Sin embargo, las herramientas diagnósticas, disponibles en la actualidad, tienen un pobre desempeño y en pocas ocasiones, modifican la conducta terapéutica inicial. Por otro lado a pesar de que la plataforma Xpert MTB/RIF ha demostrado ser de utilidad en el diagnóstico temprano de TBP, su uso no ha sido suficientemente estudiado en muestras extrapulmonares.

7. Justificación

En la actualidad no hay métodos diagnósticos ideales para la TB, cada uno de ellos posee ventajas y limitaciones.

Por ello, los estándares internacionales para el diagnóstico y tratamiento de TB (10), indican que en todo paciente con sospecha de TBE se debe coleccionar una muestra adecuada para microscopía, cultivo y estudio histopatológico, esto debido a que solamente un 5 a 10% de las muestras son positivas para tinción ZN. Además en algunos casos en particular será necesario iniciar el tratamiento antibiótico en espera de los resultados del cultivo.

En México en donde un 15.3% de las 2225 defunciones causadas por la TB en el año 2009(3), corresponden a patología extrapulmonar y donde la baciloscopia es el método diagnóstico en el 73% de los casos detectados; es necesario buscar una herramienta diagnóstica que provea de una mayor precisión diagnóstica en poco tiempo, con la finalidad de evitar retraso en el tratamiento y exposición a tratamiento de manera innecesaria a los pacientes (10).

En la actualidad información respecto al desempeño de la NAAT mediante el sistema Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de TBE es escasa y la mayoría de los estudios realizados a la fecha incluyen pocos casos de meningitis tuberculosa, la cual es considerada la forma más grave de afección pulmonar y donde es aún más importante el diagnóstico y tratamiento temprano. La NAAT Xpert MTB/RIF ha demostrado ventajas en el diagnóstico y tratamiento temprano de la TBP, las cuales de ser aplicables a los casos de TBE permitiría realizar un diagnóstico y tratamiento temprano y de esta manera mejorar el pronóstico de estos enfermos.

8. Hipótesis

La amplificación de ácidos nucleicos mediante el sistema Xpert MTB/RIF tiene mayor sensibilidad y especificidad que la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real utilizando el sistema TIB MOL BIOL en el diagnóstico de TBE considerando al cultivo de micobacterias como método de referencia.

9. Objetivos

9.1 Objetivo general

Comparar la sensibilidad y especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos mediante el sistema Xpert MTB/RIF y de amplificación de ácidos nucleicos utilizando PCR en tiempo real utilizando el sistema TIB MOL BIOL en el diagnóstico de TB extrapulmonar considerando al cultivo de micobacterias como método de referencia.

9.2 Objetivos específicos

9.2.1.- Comparar la sensibilidad y especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real mediante el sistema Xpert MPTB/RIF y de amplificación de ácidos nucleicos utilizando PCR en tiempo real utilizando el sistema TIB MOL BIOL en LCR para el diagnóstico de TBM considerando al cultivo de micobacterias como método de referencia.

9.2.2.- Comparar la sensibilidad y especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real mediante el sistema Xpert MTB/RIF y de amplificación de ácidos nucleicos utilizando PCR en tiempo real utilizando el sistema TIB MOL BIOL en tejidos de biopsias, abscesos y líquidos para el diagnóstico de TB extrapulmonar considerando al cultivo de micobacterias como método de referencia.

9.2.3.- Describir los factores inherentes al paciente que modifican el desempeño de la prueba Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de TB extrapulmonar.

9.2.4.- Describir los factores inherentes a la muestra que modifican el desempeño de la prueba Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de TB extrapulmonar.

9.2.5.- Describir la correlación entre la resistencia a rifampicina demostrada por el estudio de Xpert MTB/RIF y la resistencia demostrada por el laboratorio de microbiología.

10. Método

10.1 Diseño del estudio

Se realizará un estudio de pruebas diagnósticas en el cual se calculará la Se y Es de dos métodos de amplificación de ácidos nucleicos considerando el cultivo de micobacterias como método de referencia y además de manera exploratoria se usará un constructo diagnóstico basado en los datos clínicos (sintomatología, tiempo de evolución de la misma, resultado de estudios radiográficos y resultados de otros estudios de laboratorio) recabados de manera retrospectiva de los expedientes a los que se tenga acceso.

10.2 Población de estudio

i. Criterios de inclusión

Todas las muestras no respiratorias de pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar, que hayan sido incluidas en el protocolo de evaluación de la prueba Xpert MTB/RIF en el laboratorio de microbiología clínica del INCMNSZ en un periodo comprendido de 8 meses.

ii. Criterios de exclusión

Muestras en las que no se haya realizado cultivo.

iii. Criterios de eliminación

Muestras que tengan resultado inválido en cualquiera de las pruebas de biología molecular.

10.3 Variables

- Positividad de cultivo de micobacterias

Definido como crecimiento de micobacterias del CMTB (confirmado mediante el kit *Accuprobe M. tuberculosis complex culture confirmation*®) en cultivo sólido o líquido en un periodo comprendido de 8 semanas a partir de la fecha de incubación.

- Positividad de la NAAT Xpert MTB/RIF

Definido como la amplificación en al menos dos de los cinco *primer* utilizados por la prueba en menos de 38 ciclos con una diferencia de menos de 3.5 ciclos entre una curva de amplificación y otra.

- Positividad de la NAAT TIB MOLBIOL

Definido como la presencia de una curva de amplificación positiva compatible con *M. tuberculosis* en una prueba con criterios de validez de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- Resistencia a rifampicina por la NAAT Xpert MTB/RIF

Definido como la ausencia de una curva de amplificación de al menos uno de los cinco *primer* o retraso en la amplificación de al menos uno de los *primer* mayor a 3.5 ciclos con respecto a los demás.

- Cambios radiológicos compatibles con meningitis tuberculosa

Definido como la presencia de hidrocefalia, aracnoiditis basal, infartos en ganglios basales y/o territorios de arterias talamoperforantes o presencia de hiperdensidad en cisternas basales en un estudio no contrastado (61, 62).

- Tiempo de evolución

Definido como el periodo comprendido desde el inicio de la sintomatología hasta la fecha de toma de la muestra biológica enviada al laboratorio de microbiología clínica del INCMNSZ.

- Análisis estadístico

Las variables cualitativas dicotómicas se expresaron en frecuencias y porcentaje. En el caso de las variables continuas los datos se expresaron en medianas e intervalos intercuantílicos. Para el análisis inferencial se realizó un modelo bivariado por medio de la prueba de χ^2 para las variables dicotómicas y Kruskal wallis para las variables numéricas con uso de prueba exacta de Fisher para el cálculo de OR.

Este análisis se realizó en una base de datos en la cual se capturó la información recolectada de cada paciente y se utilizó el software de STATA versión 11.2.

11. Metodología de laboratorio

11.1 Proceso de digestión y descontaminación de la muestra (a excepción de muestras de LCR)

Se realizó por el método *N*-Acetil-L-cisteína-Hidróxido de Sodio (NALC-NaOH) descrito por Kubica y col. 1985. En breve, cada muestra se trató con 5 ml de NALC-NaOH (0.8 g / 150 ml) durante 15 min, con 3 agitaciones intermedias en intervalos de 5 min. Posteriormente, a cada muestra se le agregó amortiguador de fosfatos 0.067 M (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) hasta aforar a 45 ml y se agitó con un agitador de remolino para lavar la muestra. Se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se homogeneizó el paquete celular y con una gota de éste, se realizó un frotis el cual se tiñó por Auramina-Rodamina (AR), si en la tinción se observaba la presencia de bacilos, el frotis se tiñó nuevamente con tinción de Z-N para confirmar la presencia de BAAR. Por otro lado, el sedimento restante se neutralizó con amortiguador de fosfatos hasta ajustar a pH 7.

11.2 Cultivo

Del sedimento neutralizado se inocularon 0.5 ml en medio sólido Löwenstein-Jensen (LJ) y 0.5 ml en medio líquido MGIT (por sus siglas en inglés, Tubo indicador de crecimiento de micobacterias) enriquecido con 0.8 ml de suplemento OADC y la mezcla antimicrobina PANTA PLUS (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD), posteriormente los medios sólidos se incubaron a 37 °C con 7.5 % CO_2 durante 8 semanas y el medio líquido se incubó en el instrumento MGIT 960 a 37°C durante 56 días. Del crecimiento del cultivo en LJ, se realizó un frotis y se tiñó por Z-N, para búsqueda de BAAR. Si a las 8 semanas de incubación no se observó desarrollo, el medio de cultivo se desechó.

11.3 Identificación del CMTB

A partir del medio líquido MGIT positivo, se realizó la identificación con el kit *Accuprobe M. tuberculosis complex culture confirmation*® (Gen-Probe, San Diego, California, USA) según las instrucciones del fabricante.

11.4 Amplificación de ácidos nucleicos (TIB MOLBIOL)

Se utilizó el equipo LightMix for the detection of *Mycobacterium spp./M. tuberculosis* (TIB MOLBIOL, Bmbh, Alemania), la mezcla de reacción para la amplificación se realizó según las instrucciones del fabricante.

11.5 Amplificación de ácidos nucleicos (Xpert MTB/RIF)

Se utilizó el equipo Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA), la reacción de amplificación se realizó según las instrucciones del fabricante.

12. Resultados

12.1 Población estudiada

Durante el período de estudio se incluyeron 169 muestras, de las cuales 124 fueron de líquido cefalorraquídeo, cinco de líquido pleural, cuatro de líquido de ascitis, dos de líquido pericárdico, dos muestras intraoculares, cuatro aspirados de absceso, dos biopsias pleurales, dos biopsias de hígado, cuatro biopsias de piel, cuatro biopsias de pulmón, tres de biopsia de ganglio, tres biopsias de íleon, una biopsia meníngea, una biopsia de bazo, una biopsia de muslo y siete biopsias no clasificadas. Los datos clínicos se obtuvieron del expediente de 111 casos.

12.2 Características socio-demográficas de la población y su relación con TB

El 63% (70/111) de los sujetos de los que se obtuvo información clínica fueron hombres, la mediana de edad al momento del estudio fue 45.5 años (IIC 30-59). La mediana de índice de masa corporal (IMC) fue 23.4 kg/m² (IIC 20.83-25.56).

Con respecto a las comorbilidades presentes en la población estudiada, el 12% (14/111) de los pacientes tenía diabetes mellitus (DM), con una mediana de evolución de 17 años (IIC 4.5-23), 10% (10/111) padece LES con una mediana de tiempo de diagnóstico de 2 años (IIC 1-13 años). El 20% (22/111) de los pacientes tiene infección por VIH con una mediana de 1.5 años (IIC 1-7), el 68% (15/22) se encontraba en estadio clínico C3 y 63.6% (14/22) recibía tratamiento antirretroviral. Un 21.6% (24/111) recibía esteroides de manera crónica por diversas indicaciones médicas, con una mediana de 27.5 mg/prednisona/día (ICC 8.75-50) y una mediana de 19.5 meses (ICC 2-42 meses) de consumo.

Al momento de la toma de la muestra el 32% (35/111) de los pacientes se encontraba recibiendo tratamiento antibiótico por diversas indicaciones, de estos el 11% (4/35) se encontraba recibiendo quinolonas y el 8% (3/35) carbapenémicos.

El resto de las características demográficas y su relación con la presencia de TB se resume en las tablas 2, 8, 9 y 10.

12.3 Características de los pacientes con VIH

Del total de expedientes revisados, el 19.8% (22/111) de los pacientes presentaban infección por VIH, de los cuales el 63.6 % (14/22) se encontraban en estadio clínico C3. El resto de las características de este grupo de pacientes y la relación de las mismas con la presencia de TB se resumen en las tablas 3,11, 12 y 13.

12.4 Características de los pacientes con sospecha de neuroinfección

Se revisaron 90 expedientes de pacientes con sospecha de neuroinfección, la información de los mismos se resume en las tablas 4, 5, 6 y 7.

12.5 Determinación de la sensibilidad y especificidad por tipo de muestra.

En la tabla 15 se observa un resumen de los cálculos de Se y Es para los diferentes tipos de muestras analizadas.

13. Discusión

En el presente estudio, la NAAT mediante Xpert MTB/RIF demostró ser superior a la NAAT TBMOL BIOI, en muestras diversas de pacientes con sospecha de TBE usando como estándar de referencia el cultivo.

Es el primer estudio en México en el que se ha evaluado el rendimiento diagnóstico del sistema Xpert MTB/RIF en muestras extrapulmonares, en este estudio se incluyeron 124 muestras de LCR, la segunda población más grande de muestras de este tipo en un estudio publicado hasta la fecha, solo después del estudio publicado por Tortoli y cols.

La Se reportada para la plataforma Xpert MTB/RIF en el total de las muestras fue de 60% (IC 26% - 87%) con una Es 97% (IC 93% - 99%), lo que va acorde con la mayoría de los estudios publicados a la fecha y con una Se muy superior a la encontrada en la plataforma TIB MOLBIOL que de manera general se encontró Se de 20% (IC 2% - 55%).

Hasta la fecha se han publicado 5 estudios de evaluación del sistema Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de TBE en los que se han incluido muestras de LCR (21, 42, 44, 46, 47).

En el primero de ellos publicado por Causse y cols., se incluyeron 50 muestras de LCR pero no se reportó Se para ese grupo específico; el segundo estudio presentado por Vadwai y cols., reportó una Se de 29% (IC 4% - 71%), muy por debajo de la Se para el resto de muestras, la explicación que dieron los autores a este hecho fue el escaso volumen de la muestra (2.5 ml) y la naturaleza paucibacilar de la TBM por lo que propusieron centrifugar la muestra previo al procesamiento con la finalidad de aumentar el rendimiento diagnóstico. En 2011 Moure y cols., publicaron otro estudio en el que se incluyeron 14 muestras de LCR de las cuales solo dos tuvieron cultivo positivo, y no fue posible obtener conclusiones. Finalmente, el estudio publicado por Hillemann y cols., incluyó 19 muestras de LCR, sin embargo en este estudio no pudo calcularse la Se ya que no hubo resultados positivos con el estándar de referencia.

El estudio más grande publicado hasta la fecha sobre el uso de Xpert MTB/RIF en muestras extrapulmonares, fue realizado por Tortoli y cols., en 2012, se incluyeron 1476 muestras, de las cuales 133 (9%) fueron de LCR. En dicho estudio se utilizó como estándar de referencia el cultivo positivo para microorganismos del CMTB y de manera alterna en pacientes con cultivo negativo se utilizó la presencia de signos radiológicos o histológicos de TB asociado a mejoría del cuadro clínico posterior al inicio de tratamiento antituberculoso. La Se global reportada por el grupo de Tortoli fue de 81.3% (IC 77% - 86%) y para muestras de LCR fue de 85.7% (IC 67% - 104%).

En este estudio nosotros reportamos 10 muestras con cultivo positivo, lo que representa el 6% del total de la población analizada, un número inferior a lo reportado en los estudios realizados por Causse y cols., Hilleman y cols., y Tortoli y cols., en países de prevalencia moderada o baja, en los cuáles el porcentaje de cultivo positivo fue 12%, 11.9% y 16% respectivamente. Una posible explicación de esos hallazgos es que el 73% de muestras procesadas en este estudio fueron de LCR, y de ellas solo un 12% cumplieron criterios de meningitis linfocítica (24).

En el grupo de muestras de LCR, la Se reportada para la plataforma Xpert MTB/RIF fue 71% (IC 29% - 96%) y Es 99% (IC 95% - 99%) (similar a la reportada por Tortoli y cols.), en comparación con la prueba TIB MOLBIOL cuya Se y Es fue 0.28 (0.03-0.70) y 0.98 (0.93-0.99) respectivamente. Aun cuando ambas pruebas muestran una Es similar, los valores de LR negativo cercanos a la unidad de las pruebas Xpert 0.28 (0.15-0.67) y TIBMOLBIOL 0.72 (0.48-0.97) sugieren que un resultado negativo ambas pruebas no es capaz de descartar la presencia de TB.

En lo que respecta a la Se reportada para biopsias, líquidos y abscesos fue de 33% (IC 0% - 90%). Previamente otros estudios reportaron un rendimiento diagnóstico inferior en los líquidos obtenidos de cavidad pleural y abdominal. En el estudio publicado por Tortoli y cols., la Se en muestras de líquido pleural fue de 44% (IC 21% - 67%) y para líquidos de otras cavidades (incluido el líquido de ascitis) fue 50% (IC 19% - 81%); en el estudio de Moure y colaboradores la Se reportada fue de 26.9% para líquido pleural y 40.5% para todos los líquidos obtenidos de cavidades y el estudio de Friedrich y cols., demostró una Se 25% en líquido pleural.

Las explicaciones que se han dado por el bajo rendimiento de las NAAT en las muestras de líquidos estériles incluyen la naturaleza paucibacilar en este tipo de infecciones, la presencia de inhibidores y el proceso de descontaminación previo al procesamiento de la muestra. Lo anterior contrasta con el estudio publicado por Vadwai y cols., en el que la Se reportada en líquido pleural fue del 63% (IC 42% - 81%).

Con respecto a los factores de riesgo asociados a la aparición de TBE, solamente la presencia de infección por VIH logró una asociación estadísticamente significativa con el cultivo, [OR de 4.7 (IC 0.78 – 27.4)], sin que esta asociación se mantuviera con la NAAT Xpert MTB/RIF o TIB MOLBIOL, lo que podría explicar el bajo porcentaje de resultados positivos en nuestro estudio.

El bajo porcentaje de resultados positivos en el presente estudio permite obtener pocas conclusiones, en lo que respecta a asociación con otras patologías, por lo que es necesario ampliar la muestra del estudio a fin de definir mejor estas variables.

14. Conclusiones

La sensibilidad de la NAAT mediante Xpert MTB/RIF es mayor que la sensibilidad de la NAAT TIB MOLBIOL para la detección de MTB en muestras extrapulmonares con especificidad comparable.

La sensibilidad de Xpert MTB/RIF fue mayor en LCR que en el resto de las muestras extrapulmonares.

La especificidad en LCR con ambas pruebas es similar. Los resultados de estas pruebas ayudan para definir el diagnóstico pero no sustituyen el criterio clínico ni reemplazan el cultivo.

La NAAT Xpert MTB/RIF tiene un alto potencial para confirmar el diagnóstico de TBE, sin embargo un resultado negativo no descarta el diagnóstico.



Figura 1. Países en los que se agrupa el 89% de los casos de TB en el mundo

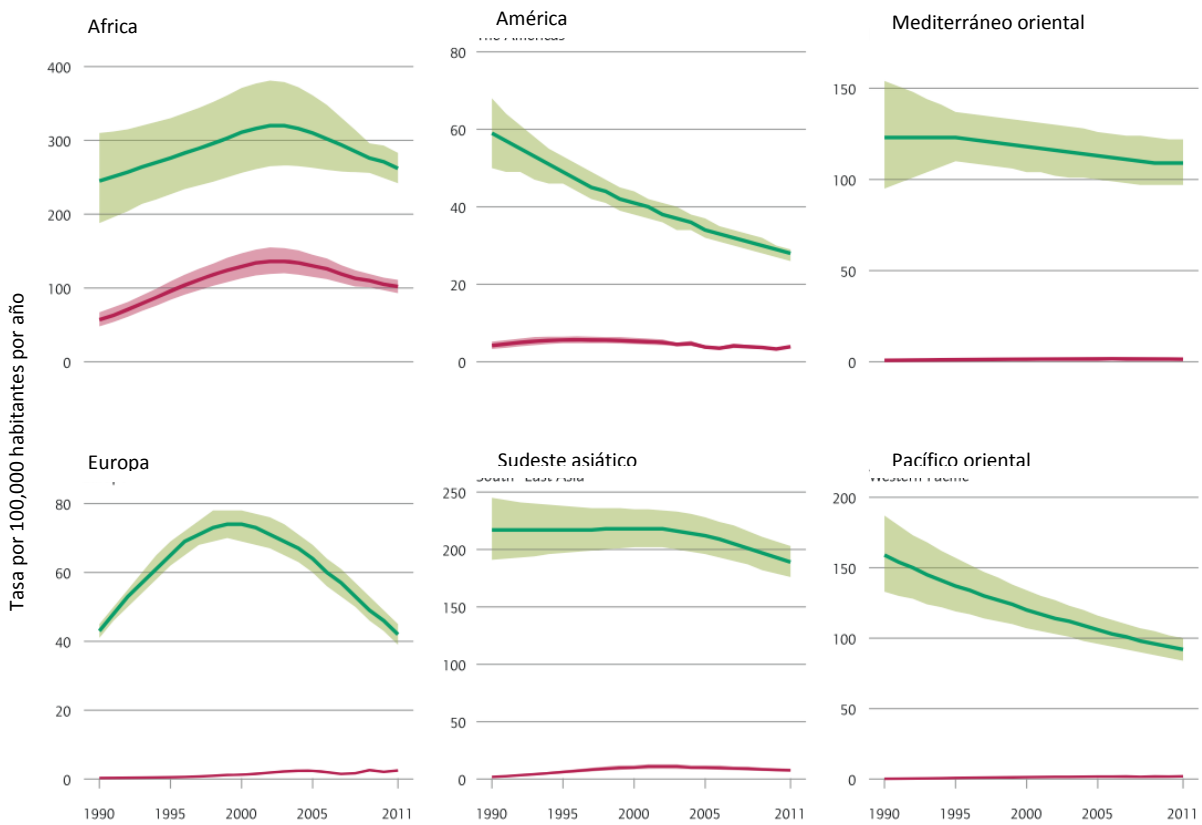


Figura 2. Incidencia estimada de TB por la OMS, 1990-2011.

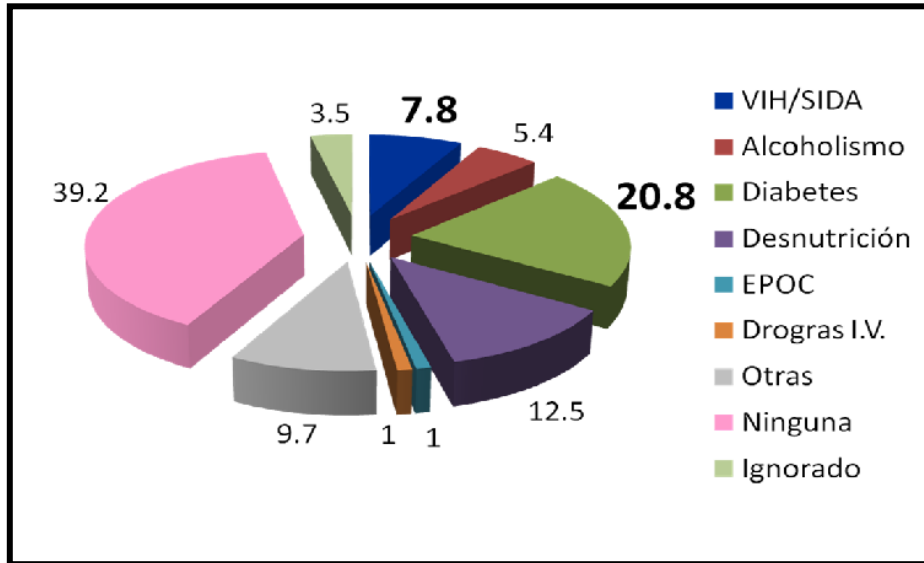


Figura 3. Comorbilidades asociadas a la aparición de TB (porcentaje).

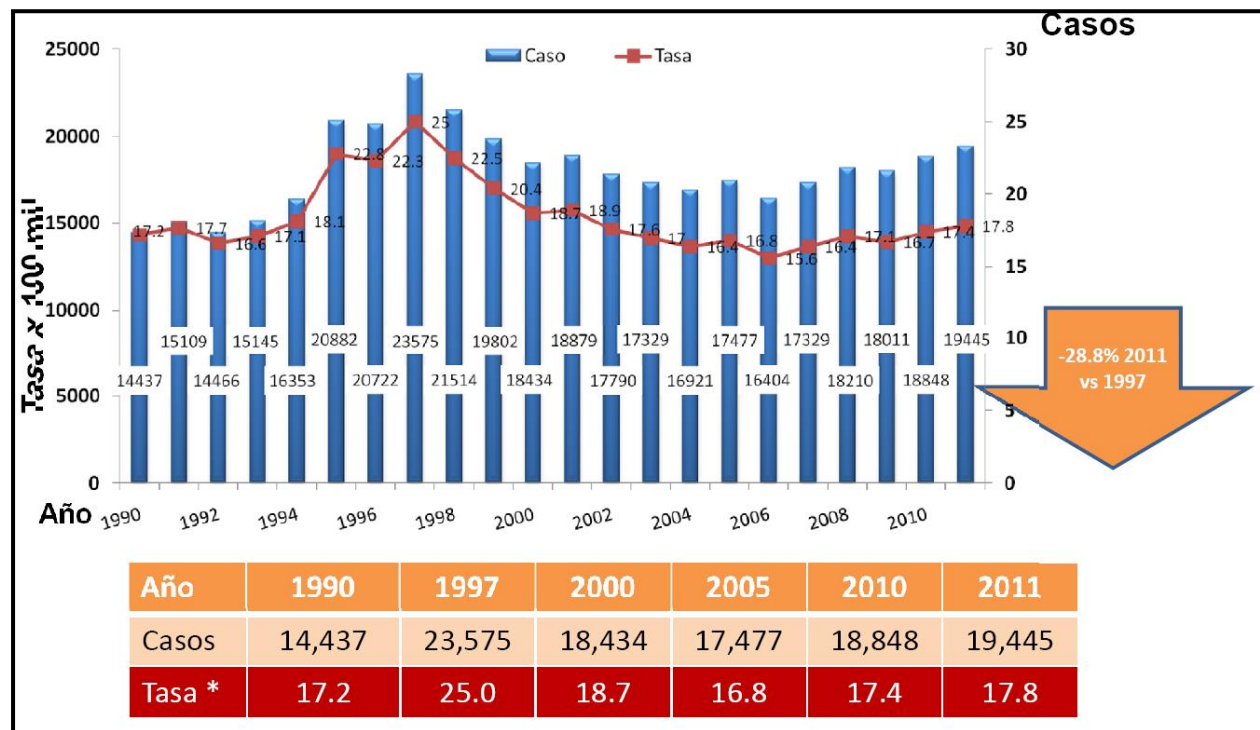


Figura 4. Incidencia de la TB en México, 1990-2010.

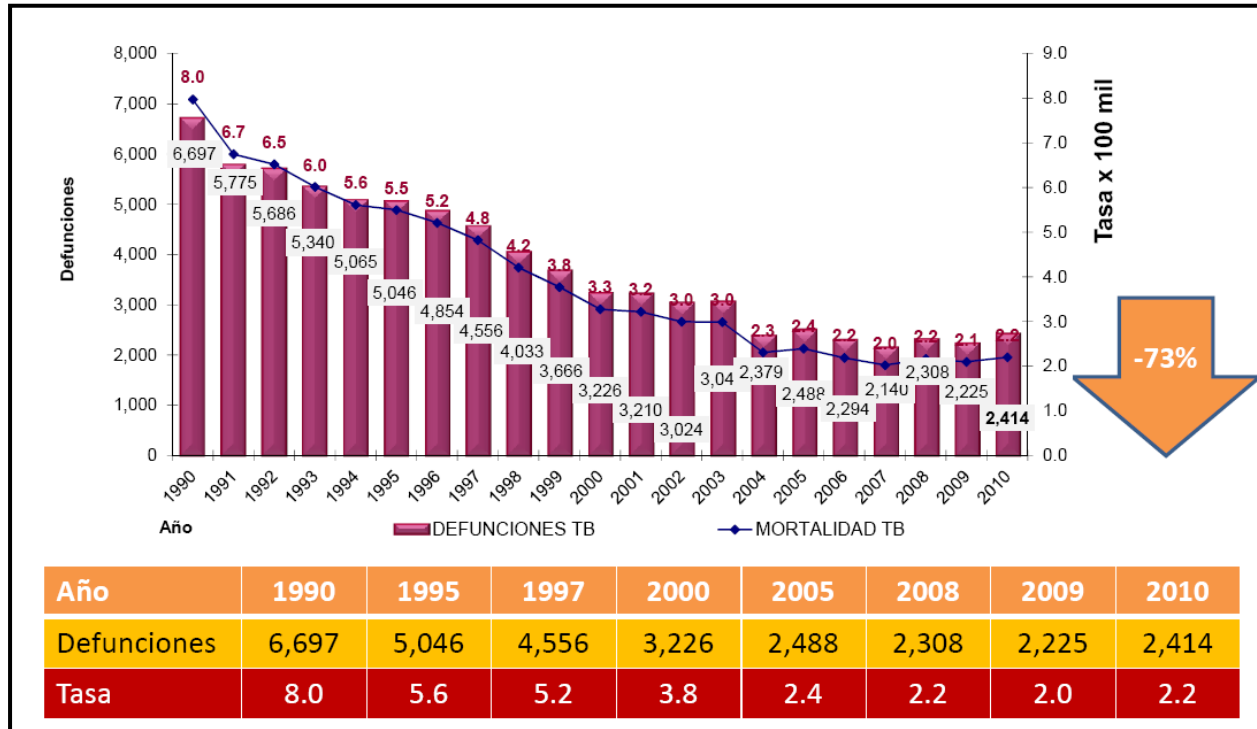


Figura 5. Mortalidad causada por TB en México, 1990-2010.

Tabla 1. Resultados de la distribución del tipo de muestras analizadas.

Tipo de muestra	n/n	(%)
Líquido cefalorraquídeo	124/169	(73.3%)
Líquido pleural	5/169	(2.9%)
Líquido de ascitis	4/169	(2.3%)
Líquido pericárdico	2/169	(1.1%)
Aspirados intraoculares	2/169	(1.1%)
Abscesos	4/169	(2.3%)
Biopsias pleurales	2/169	(1.1%)
Biopsias de hígado	2/169	(1.1%)
Biopsias de piel	4/169	(2.3%)
Biopsias de pulmón	4/169	(2.3%)
Biopsia de ganglio	3/169	(1.7%)
Biopsias de íleon	3/169	(1.7%)
Biopsia meníngea	1/169	(0.6%)
Biopsia de bazo	1/169	(0.6%)
Biopsia de muslo	1/169	(0.6%)
Biopsias no clasificadas	7/169	(4.1%)

Tabla 2. Resultados de las características demográficas de los pacientes.

Características	n/n	(%)
	Mediana	(IIC)
Edad	45.5 años	(IIC 30-59)
Género (Masculino)	70/111	(63%)
IMC	23.4 kg/m ²	(IIC 20.83-25.56)
Comorbilidades		
DM	14/109	(12.8%)
IRC	4/108	(3.7%)
LES	10/110	(9%)
AR	4/110	(3.6%)
Consumo crónico de esteroides	24/111	(21.6%)
Dosis de esteroides	27.5 mg/pdn/día	(ICC 8.75-50)
Exposición a antibióticos en el mes previo	35/103	(33.9%)
Quinolonas	4/35	(11%)
Carbapenémicos	3/35	(8%)

pdn=prednisona

Tabla 3. Resultados de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH.

Características de los pacientes con VIH	n/n	(%)
	Mediana	(IIC)
Número de pacientes	22/111	(19.8%)
Tiempo con diagnóstico de VIH	1.5 años	(IIC 1-7)
Pacientes en tratamiento antirretroviral	14/22	(63.6%)
Estadio clínico		
C3	15/22	(68.1%)
B3	1/22	(4.5%)
B2	2/22	(9.0%)
A2	2/22	(9.0%)
Tipo de tratamiento antirretroviral		
Emtricitabina, tenofovir, efavirenz	5/14	(35.7%)
Abacavir, lamivudina, efavirenz	5/14	(35.7%)
Emtricitabina, tenofovir, lopinavir, ritonavir	2/14	(14.2%)

Tabla 4. Resultados de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección.

Características del episodio	n/n	(%)
	Mediana	(IIC)
Sospecha de afección a SNC	90/111	(81%)
Fiebre	30/81	(37.04%)
Tiempo de evolución de fiebre	10	(1-16)
Cefalea	36/80	(45%)
Intensidad de la cefalea	7	(5-9)
Punción lumbar		
Leucocitos	0	(0-12)
Glucosa	56.7	(47.2-68.4)
Proteínas	47	(32-82)
TC de cráneo		
Datos compatible con TB	7/31	

Tabla 5. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección y su relación con el resultado del cultivo.

	Cultivo +	Cultivo -	OR (IC 95%)	p*
Sospecha de afección a SNC	6/90	84/90		
Fiebre	3/4	27/77	5.5 (0.47-145)	0.10
Tiempo de evolución de fiebre	14 (10-23)	6 (1-13)		0.20
Cefalea	3/4	32/75	4.0 (0.34-105)	0.20
Intensidad de la cefalea	4 (4-4)	7 (5-9)		0.10
Punción lumbar				
Leucocitos	91 (37-223)	0 (0-7)		0.01
Glucosa	31.6 (12.2-48.9)	57 (48-69)		0.01
Proteínas	110 (32-134)	4 (32-71)		0.02
TC de cráneo				
Compatible con TB	1/3	5/34	2.9 (0.08-57)	0.4

*Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas.

Tabla 6. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección y su relación con el resultado de la prueba Xpert MTB/RIF.

	Xpert MTB/RIF +	Xpert MTB/RIF -	OR (IC 95%)	p*
Sospecha de afección a SNC	3/90 (3.33)	87 (96.6)		
Fiebre	2/3	28/78	3.5 (0.23-104)	0.27
Tiempo de evolución de fiebre	16.5 (10-23)	6.5 (1-14)		0.34
Cefalea	2/3	33/76	2.6 (0.17-76)	0.42
Intensidad de la cefalea	ND	ND		ND
Punción lumbar				
Leucocitos	54.5 (37-187)	0 (0-7)		0.004
Glucosa	32 (12.6-48.9)	57 (48-69.5)		0.016
Proteínas	110 (97-221)	46 (32-71)		0.015
TC de cráneo				
Compatible con TB	1/2	5/35	6 (0.13-275)	0.18

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas.

Tabla 7. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección y su relación con el resultado de la prueba TIB MOLBIOL.

	TIB MOLBIOL +	TIB MOLBIOL -	OR (IC 95%)	p*
Sospecha de afección a SNC	2/90 (2.22)	88/90 (97.78)		
Fiebre	1/2	29/79	1.7 (0.04-66)	0.7
Tiempo de evolución de fiebre	ND	ND		ND
Cefalea	1/2	34/77	1.26 (0.03-48)	0.87
Intensidad de la cefalea	4 (4-4)	7 (5-9)		0.10
Punción lumbar				
Leucocitos	0 (0-0)	0 (0-12)		0.21
Glucosa	68.1 (66-70.3)	56 (47.2-66.5)		0.20
Proteínas	96 (0-192)	47 (34-72)		0.85
TC de cráneo				
Compatible con TB	0/2	6/35	ND	0.52

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas.

Tabla 8. Resultados de las Características demográficas de los pacientes y su relación con el resultado del cultivo.

	Cultivo +	Cultivo -	OR (IC 95%)	p*
	8	103		
Edad	38 (32.5-48.5)	46 (30-59)		0.54
Género (Masculino)	7/8 (87.5)	63/103 (61.1)	4.4 (0.53-205)	0.13
IMC	21.3 (15-24)	23.5 (21.2-25.6)		0.11
Comorbilidades				
DM	0/8	14/101	ND	0.25
IRC	1/8	3/100	4.6 (0.16-64)	0.17
LES	1/8	9/102	1.4 (0.06-14)	0.72
AR	0/8	4/102	ND	0.56
Consumo crónico de esteroides	2/8	22/103	1.2 (0.15-7.5)	0.81
Dosis de esteroides	30 (30-30)	22.5 (7.5-50)		0.75
Exposición a antibióticos en el mes previo	5/8	30/95	3.6 (0.68-20)	0.07
Quinolonas	0/5	4/30	ND	0.38
Carbapenémicos	0/5	3/30	ND	0.46

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas.

Tabla 9. Resultados de las características demográficas de los pacientes y su relación con el resultado de la prueba Xpert MTB/RIF.

	Xpert MTB/RIF +		Xpert MTB/RIF -		OR (IC 95%)	p*
	5		106			
Edad	31	(29-40)	46	(30-59)		0.22
Género (Masculino)	5/5	(100)	65/106	(61.3)	ND	0.13
IMC	22.5	(19.4-23.5)	23.4	(21-25.6)		0.26
Comorbilidades						
DM	0/5		14/104		ND	0.38
IRC	0/5		4/103		ND	0.65
LES	0/5		10/105		ND	0.46
AR	0/5		4/105		ND	0.65
Consumo crónico de esteroides	1/5		23/106		0.9 (0.03-9.3)	0.92
Dosis de esteroides	30	(30-30)	22.5	(7.5-50)		0.82
Exposición a antibióticos en el mes previo	4/5		31/98		8.6 (0.8-212)	0.02
Quinolonas	0/4		4/31		ND	0.44
Carbapenémicos	0/4		3/31		ND	0.51

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas.

Tabla 10. Resultados de las características demográficas de los pacientes y su relación con el resultado de la prueba TIB MOLBIOL.

	TIB MOLBIOL +		TIB MOLBIOL -		OR (IC 95%)	p*
Característica	2		109			
Edad	46	(46-46)	43	(30-59)		0.94
Género (Masculino)	2/2	(100)	68/109	(61.3)	ND	0.27
IMC	25.2	(24-26.3)	23.4	(20.3-25.5)		0.37
Comorbilidades						
DM	1/2		13/107		7.2 (0.18-286)	0.11
IRC	0/2		4/106		ND	0.78
LES	0/2		10/108		ND	0.65
AR	0/2		4/108		ND	0.78
Consumo crónico de esteroides	0/2		24/109		ND	0.45
Dosis de esteroides	ND		27.5	(8.75-50)		ND
Exposición a antibióticos en el mes previo	0/2		35/101		ND	0.30
Quinolonas	0		4/35			1.0
Carbapenémicos	0		3/35			1.0

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

Tabla 11. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH y su relación con el resultado del cultivo.

	Cultivo +	Cultivo -	OR (IC 95%)	p*
	8	103		
Pacientes con infección por VIH	4/8	18/103	4.7 (0.88-25)	0.02
Tiempo con diagnóstico de VIH	1.5 (1-2.5)	3 (1-7)		0.53
Pacientes en tratamiento antirretroviral	2/4	12/18	0.5 (0.03-6.8)	0.53
Estadio clínico				
C3	4/15	4/96	8.3 (1.4-48)	0.002
B3	0/8	1/103	ND	0.78
B2	0/8	2/103	ND	0.69
A2	0/8	2/103	ND	0.69

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas.

Tabla 12. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH y su relación con el resultado de la prueba Xpert MTB/RIF.

	Xpert MTB/RIF +	Xpert MTB/RIF -	OR (IC 95%)	p*
	5	106		
Pacientes con infección por VIH	2/5	20/106	2.8(0.39-23)	0.24
Tiempo con diagnóstico de VIH	1 (1-1)	2.5 (1-7)		0.28
Pacientes en tratamiento antirretroviral	0/1	14/21	ND	0.05
Estadio clínico				
C3	2/5	13/106	4.7(0.49-45)	0.07
B3	0/5	1/103	ND	0.78
B2	0/5	2/103	ND	0.69
A2	0/5	2/103	ND	0.69

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

Tabla 13. Resultados del análisis de las características de los pacientes con infección por VIH y su relación con el resultado de la prueba TIB MOLBIOL.

	TIB MOLBIOL +	TIB MOLBIOL -	OR (IC 95%)	p*
	2	109		
Pacientes con infección por VIH	1/2	21/109	4.1 (0.10-161)	0.28
Tiempo con diagnóstico de VIH	5 (5-5)	1 (1-7)		0.68
Pacientes en tratamiento antirretroviral	0/1	12/18	ND	0.53
Estadio clínico				
C3	0/2	15/109	ND	0.57
B3	0/2	1/109	ND	0.89
B2	1/2	1/109	108 (1.5-258)	0.00
A2	0/2	2/109	ND	0.84

Chi cuadrada de Pearson en variables categóricas y prueba exacta de Fisher para variables continuas

Tabla 14. Resultado de la determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas XpertMTB y TIBMOLBIOL por tipo de muestra.

			Cultivo			
			Positivo	Negativo	Subtotal	Se y Es (IC 95%)
LCR	XpertMTB	Positivo	5	1	6	Se 0.71 (0.29-0.96)
		Negativo	2	116	118	Es 0.99 (0.95-0.99)
		Subtotal	7	117	124	
	TIBMOLBIOL	Positivo	2	2	4	Se 0.28 (0.03-0.70)
		Negativo	5	115	120	Es 0.98 (0.93-0.99)
		Subtotal	7	117	124	
Biopsias, líquidos varios y abscesos	XpertMTB	Positivo	1	3	4	Se 0.33 (0.0-0.9)
		Negativo	2	39	41	Es 0.92 (0.80-0.98)
		Subtotal	3	42	45	
	TIBMOLBIOL	Positivo	0	3	3	S NA
		Negativo	3	39	42	Es 0.92 (0.80-0.98)
		Subtotal	3	42	45	
Totales	XpertMTB	Positivo	6	4	10	Se 0.6 (0.26-0.87)
		Negativo	4	155	159	Es 0.97 (0.93-0.99)
		Subtotal	10	159	169	
	TIBMOLBIOL	Positivo	2	5	7	Se 0.2 (0.02-0.55)
		Negativo	8	154	162	Es 0.96 (0.92-0.98)
		Subtotal	10	159	169	

Tabla 15. Resultados del análisis de las características clínicas de los pacientes y el resultado positivo de todas las pruebas diagnósticas utilizadas en el estudio.

Características clínicas															
Caso	Edad	Sitio de muestra	VIH/Estadio SIDA	Tratamiento antirretroviral	Enfermedad del tejido conectivo	DM	Consumo de esteroides	Falleció a causa de TB	Aislamiento	Sitio de aislamiento	Tinción ZN	Xpert/TIB MOLBIOL	Rp antiTB previo	Inició Rp antiTB	Mejoría del cuadro
1	57	Pleural	No	-	-	No	No	No	<i>M.</i>	Pleura	-	+/-	Si	Si	
									<i>tuberculosis</i>	I					
2	46	LCR	Si/B2	No	-	Si	No	No	ND	-	-	-/+	N	-	
													o		
3	31	LCR	No	-	-	No	No	No*	ND	-	-	+/-	Si	Si	Si
4	46	LCR	No	-	-	No	No	No	ND	-	-	-/+	N	-	
													o		
5	20	LCR	Si/C3	No	-	No	No	Si	<i>M.</i>	LCR	-	+/-	Si	N	
									<i>tuberculosis</i>					o	
6	40	LCR	No	-	Si	No	30 mg PDN	No	<i>M.</i>	LCR	-	+/-	Si	Si	Si
									<i>tuberculosis</i>						
7	36	Ascitis	No	-	Si	No	30 mg PDN	No	<i>M. bovis</i>	Ascitis	-	-/-	Si	Si	
8	29	LCR intestinal	Si/C3	No	-	No	No	-	<i>M. bovis</i>	LCR	-	+/-	Si	Si	
9	69	LCR	No	-	-	No	No	No	<i>M.</i>	LCR	-	-/-	Si	Si	
									<i>tuberculosis</i>						

15. Bibliografía

1. Fitzgerald DW. Chapter 250: Mycobacterium tuberculosis. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010, p. 3129-3163.
2. WHO, Global tuberculosis report 2012, ingreso a través de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
3. Lawn SD, Nicol MP. "Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance." Future Microbiol. 2011 Sep; 6(9):1067-82.
4. Tuberculosis panorama epidemiológico en México ¿?????
5. WHO, Treatment of tuberculosis: guidelines 4th ed, ingreso a través de http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833_eng.pdf
6. WHO, Rapid Implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test 2011, ingreso a través de http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569_eng.pdf.
7. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al. "Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria." J Clin Microbiol. 1999 Mar; 37(3):748-52.
8. Barnes PF. "Rapid diagnostic tests for tuberculosis: progress but no gold standard." Am J Respir Crit Care Med. 1997 May; 155(5):1497-8.
9. Chang K, Lu W, Wang J, et al. "Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis." J Infect. 2012 Jun; 64(6):580-8.
10. Steingart KR, Sohn H, Schiller I, et al. "Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults." Cochrane Database Syst Rev. 2013 Jan 31;1:CD009593.

11. TBCTA, International standards for tuberculosis care, ingreso a través de http://www.who.int/tb/publications/2006/istc_report.pdf
12. Keshavjee S, Farmer PE. "Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine." *N Engl J Med*. 2012 Sep 6;367(10):931-6.
13. [No authors listed]. "Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis." *Br Med J*. 1948 Oct 30;2(4582):769-82.
14. Selikoff IJ, Robitzek EH, Ornstein GG. "Treatment of pulmonary tuberculosis with hydrazide derivatives of isonicotinic acid." *J Am Med Assoc*. 1952 Nov 8;150(10):973-80.
15. Fox W, Wiener A, Mitchison DA, et al. "The prevalence of drug-resistant tubercle bacilli in untreated patients with pulmonary tuberculosis; a national survey, 1955-56." *Tubercle*. 1957 Apr;38(2):71-84.
16. Steiner M, Chaves AD, Lyons HA, et al. "Primary drug-resistant tuberculosis. Report of an outbreak." *N Engl J Med*. 1970 Dec 17;283(25):1353-8.
17. Manten A, Van Wijngaarden LJ. "Development of drug resistance to rifampicin." *Chemotherapy*. 1969;14(2):93-100.
18. Lawn SD, Mwaba P, Bates M, et al. "Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test." *Lancet Infect Dis*. 2013 Apr;13(4):349-61.
19. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, et al. "Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*." *PLoS Pathog*. 2005; 1(1): e5.
20. Bawa N, Goel N, Sood R, et al. Chapter 21. Laboratory diagnosis of mycobacterial infection in children. Vimlesh S. "Essentials Of Tuberculosis In Children", 3rd Edition. Jaypee Brothers Medical Publisher (P) Ltd 2006.P. 365-366

21. Causse M, Ruiz P, Gutiérrez-Aroca JB, Casal M. "Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis." *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3065-7.
22. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, et al. "Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens." *J Clin Microbiol*. 2011 May;49(5):1772-6.
23. Rock RB, Olin M, Baker CA, et al. "Central nervous system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects." *Clin Microbiol Rev*. 2008 Apr;21(2):243-61.
24. Hosoglu S, Geyik MF, Balik I, et al. "Predictors of outcome in patients with tuberculous meningitis." *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002 Jan;6(1):64-70.
25. Golden MP, Vikram HR. "Extrapulmonary tuberculosis: an overview." *Am Fam Physician*. 2005 Nov 1;72(9):1761-1768.
26. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, et al. "Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA." *J Clin Microbiol*. 1990 Aug;28(8):1751-9.
27. Wiener RS, Della-Latta P, Schluger NW. "Effect of nucleic acid amplification for *Mycobacterium tuberculosis* on clinical decision making in suspected extrapulmonary tuberculosis." *Chest*. 2005 Jul;128(1):102-7.
28. Gaby E. Pfyffer, Capítulo 36. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. Patrick R Murray; Ellen Jo Baron; et al. *Manual of clinical microbiology*. 9th edition. Washington, D.C.: ASM Press, 2007.
30. van Zyl-Smit RN, Binder A, Meldau R, et al. "Comparison of quantitative techniques including Xpert MTB/RIF to evaluate mycobacterial burden." *PLoS One*. 2011;6(12):e28815.
31. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 Jan 16;58(1):7-10.

32. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. "Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance." *N Engl J Med*. 2010 Sep 9;363(11):1005-15.
33. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. "Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study." *Lancet*. 2011 Apr 30;377(9776):1495-505.
34. Helb D, Jones M, Story E, et al. "Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology." *J Clin Microbiol*. 2010 Jan;48(1):229-37.
35. Carpentier E, Drouillard B, Dailloux M, et al. "Diagnosis of tuberculosis by Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study." *J Clin Microbiol*. 1995 Dec;33(12):3106-10.
36. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al. "Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA." *J Clin Microbiol*. 1993 Sep;31(9):2410-6.
37. Coros A, DeConno E, Derbyshire KM. "IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species." *J Bacteriol*. 2008 May;190(9):3408-10.
38. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. "Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology." *J Clin Microbiol*. 1993 Feb;31(2):406-9.
39. Thwaites G, Fisher M, Hemingway C, et al. "British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children." *J Infect*. 2009 Sep;59(3):167-87.
40. Raja S, Ching J, Xi L, et al. "Technology for automated, rapid, and quantitative PCR or reverse transcription-PCR clinical testing." *Clin Chem*. 2005 May;51(5):882-90.

41. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. "Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens." *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4138-41.
42. Vadwai V, Boehme C, Nabeta P, et al. "Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis?" *J Clin Microbiol.* 2011 Jul;49(7):2540-5.
43. Ligthelm LJ, Nicol MP, Hoek KG, et al. "Xpert MTB/RIF for rapid diagnosis of tuberculous lymphadenitis from fine-needle-aspiration biopsy specimens." *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3967-70.
44. Moure R, Martín R, Alcaide F. "Effectiveness of an integrated real-time PCR method for detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples in an area of low tuberculosis prevalence." *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):513-5.
45. Friedrich SO, von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH. "Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis." *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4341-2.
46. Hillemann D, Rüsck-Gerdes S, Boehme C, et al. "Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system." *J Clin Microbiol.* 2011 Apr;49(4):1202-5.
47. Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, et al. "Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis." *Eur Respir J.* 2012 Aug;40(2):442-7.48. Scott LE, McCarthy K, Gous N, et al. "Comparison of Xpert MTB/RIF with other nucleic acid technologies for diagnosing pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting: a prospective study." *PLoS Med.* 2011 Jul;8(7):e1001061.
49. Antonenka U, Hofmann-Thiel S, Turaev L, et al. "Comparison of Xpert MTB/RIF with ProbeTec ET DTB and COBAS TaqMan MTB for direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimens." *BMC Infect Dis.* 2013 Jun 20;13:280.
50. Thwaites GE, Chau TT, Farrar JJ. "Improving the bacteriological diagnosis of tuberculous meningitis." *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):378-9.

51. Ormerod LP. "Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment." *Br Med Bull*. 2005 Jun 14;73-74:17-24
52. Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. "Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review." *Thorax*. 2006 Feb; 61(2):158-63.
53. Ogawa SK, Smith MA, Brennessel DJ, et al. "Tuberculous meningitis in an urban medical center." *Medicine (Baltimore)*. 1987 Jul; 66(4):317-26.
54. Stewart S. "The bacteriological diagnosis of tuberculous meningitis." *J Clin Pathol*. 1953 Aug;6(3):241-2.
55. Herodoto (autor), Godley A. D. (traductor). Capítulo 88, libro VII, sección 3. Las guerras persas. Loeb Classical Library; 1992 .
56. Hipocrates (autor), Adams F (traductor). *Epidemics (3rd Edition)*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA; 1939.
57. Drobniewski FA, Pozniak AL. "Molecular diagnosis, detection of drug resistance and epidemiology of tuberculosis." *Br J Hosp Med*. 1996 Sep 4-17;56(5):204-8.
58. Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al. "Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin." *N Engl J Med*. 1993 Feb 25;328(8):527-32.
59. Pablos-Méndez A, Raviglione MC, Laszlo A, et al. "Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance." *N Engl J Med*. 1998 Jun 4;338(23):1641-9.
60. Gaby E. Pfyffer, Capítulo 36. *Mycobacterium* : general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. Patrick R Murray; Ellen Jo Baron; et al. *Manual of clinical microbiology*. 9th edition. Washington, D.C. : ASM Press, 2007.

61. Hsieh FY, Chia LG, Shen WC. "Locations of cerebral infarctions in tuberculous meningitis." *Neuroradiology*. 1992;34(3):197-9.
62. Ozateş M, Kemaloglu S, Gürkan F, et al. "CT of the brain in tuberculous meningitis. A review of 289 patients." *Acta Radiol*. 2000 Jan;41(1):13-7.
63. Pai M, Flores LL, Pai N, et al. "Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 633–43