



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN**

**XPERT MTB/RIF EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR  
EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LA ESPECIALIDAD EN MEDICINA INTERNA**

**P R E S E N T A**

**Dr. Oscar Morado Aramburo**

Tutores de tesis:

**Dr. Pedro Torres González**

**Dr. José Sifuentes Osornio**

Ciudad de México  
2016



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.

**Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar  
en un hospital de tercer nivel**



**INCMNSZ**  
INSTITUTO NACIONAL  
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"  
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA  
México, D.F.

**Dr. Sergio Ponce de León Rosales**  
Director de Enseñanza INCMNSZ

**Dr. Alfonso Guías Herrero**  
Subdirector de Servicios Médicos  
Profesor Titular del Curso de Medicina Interna del INCMNSZ

**Dr. Pedro Torres González**  
Profesor Adscrito al Servicio de Infectología del INCMNSZ  
Tutor de Tesis

**Dr. José Sifuentes Osornio**  
Director de Medicina del INCMNSZ  
Tutor de Tesis

**Dr. Oscar Morado Aramburo**  
Residente de Cuarto Año de Medicina interna del INCMNSZ

## ÍNDICE

1.- Introducción.....	4
2.- Marco teórico.....	4
2.1.- Métodos diagnósticos.....	7
3.- Definición del problema.....	11
4.- Justificación.....	11
5.- Objetivos.....	12
6.- Metodología.....	12
7.- Resultados.....	14
8.- Discusión.....	19
9.- Conclusiones.....	20
10.- Bibliografía.....	21

## 1 Introducción

La enfermedad por tuberculosis (TB) es 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 <sup>(1)</sup>. 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” (TAES) <sup>(31, 32)</sup>. Lo anterior con la finalidad de lograr para el año 2000 la cura del 85% de los casos detectados mediante tinción Ziehl-Neelsen (ZN) <sup>(33)</sup>. Sin embargo, las metas fijadas no pudieron ser alcanzadas, por lo que la OMS estableció el año 2015 como el nuevo plazo para lograr éstos objetivos. Logrando ese año disminuir la incidencia por TB de manera global, casi se alcanzó la meta de disminución de la tasa de mortalidad y prevalencia al 50% en comparación a 1990. <sup>(2, 53)</sup>.

En el 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) <sup>(2)</sup>.

El 89% de los casos de TB diagnosticados en el mundo se agrupan en 96 países entre los cuales se incluye México <sup>(2)</sup>. 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) <sup>(3)</sup>. 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%) <sup>(4)</sup>.

Según 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 <sup>(4)</sup>. 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; posteriormente en el 2013 en LCR, y otros tejidos no respiratorios (ganglios linfáticos y biopsias pleurales) <sup>(6)</sup>.

## 2 Marco teórico

En 1882 Robert Koch demostró el origen infeccioso de la TB ante la Sociedad de Fisiología de Berlín. 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 TAES es menos efectivo en este grupo y el uso de fármacos de segunda línea está asociado a una mayor toxicidad <sup>(33)</sup>.

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.

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 <sup>(32, 36)</sup>.

### **a) Microbiología de *M. tuberculosis***

El Complejo *Mycobacterium tuberculosis* pertenece a la orden Actinomycetales, familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium*. Comprende siete especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinepedii* y *M. Microti* <sup>(12)</sup>. Estas micobacterias, 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 y una amplia gama de lípidos, ésta 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 <sup>(17)</sup>. Los seres humanos son el único reservorio para la especie *M. tuberculosis*.

### **b) Epidemiología**

En el 2014 se estimó una incidencia de 9.6 millones de casos de TB en todo el mundo, los cuales se localizaron de la siguiente forma: Asia (58%), África (28%), Mediterráneo Oriental (8%), Europa (3%) y América (3%). De los 9.6 millones de casos nuevos en el 2014,

1.2 millones (12%) correspondieron a personas coinfectadas con VIH. La proporción de nuevos casos de TB coinfectados con VIH es mayor en los países de África; en general en esta región se estima el 74% de estos casos. En el 2015 la tasa de incidencia de la TB ha disminuido en un promedio de 1.5% por año desde el 2000 y es actualmente 18% más baja que ese año <sup>(2)</sup>.

A nivel mundial, la prevalencia de TB en el 2014 fue de 13 millones de casos, para el 2015 la tasa disminuyó un 42% comparada con la de 1990. Para el año 2014, la presencia de cepas MDR-TB se calculó en 0.48 millones de casos nuevos <sup>(2)</sup>.

En 2014 se estimó una mortalidad de 1.5 millones y un aproximado de 0.4 millones de muertes debido a TB en personas coinfectadas con VIH. La TB es junto con la infección por el VIH, una de las principales causas de mortalidad en el mundo. En el 2015 las tasa de mortalidad se redujó un 47% comparada con la de 1990 <sup>(2)</sup>.

En México 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 <sup>(4)</sup>. En el año 2011, se reportaron 2,414 defunciones debido a la TB, de las que 2116 (87.7%) correspondieron a TB pulmonar. En México las principales enfermedades relacionadas con la presencia de TB son diabetes y desnutrición. En nuestro país la incidencia de la TB se encuentra en descenso, desde el año 1997 hasta el año 2011 la reducción de la incidencia ha sido de un 28.8%. En la mortalidad 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. 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.

### **c) Tuberculosis extrapulmonar**

El cuadro clínico 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).

En ausencia de afección pulmonar, el diagnóstico de la TBE presenta dificultades clínicas y técnicas importantes, debido a que con frecuencia las manifestaciones clínicas son inespecíficas. 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 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.

Por tal motivo, los estándares internacionales para el diagnóstico y tratamiento de tuberculosis, indican que en todo paciente con sospecha de TBE se debe colectar 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 <sup>(10)</sup>. En algunos casos, es necesario iniciar el tratamiento antibiótico de manera empírica, mientras se esperan los resultados del cultivo.

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 <sup>(15)</sup>. 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. 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 <sup>(15)</sup>. 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 <sup>(16)</sup>.

## **2.1 Métodos diagnósticos**

Se han desarrollado varias técnicas de laboratorio 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) <sup>(1)</sup>.

### **a) Tinción ácido-alcohol resistente**

En la tinción de Ziehl-Neelsen los organismos aparecen como bacilos de 2 a 4 micras de largo y 0.2 a 0.5 de ancho. Se estima que 5,000 a 10,000 organismos/ml de esputo se

requieren para observar un frotis positivo <sup>(1)</sup>. 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% <sup>(15, 31, 34, 35)</sup>.

### **b) Cultivo**

El cultivo de muestras clínicas es el método diagnóstico definitivo de la TB. Las muestras de expectoración 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 CO<sub>2</sub>. 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 <sup>(1)</sup>. Los sistemas comerciales automatizados facilitan el cultivo de micobacterias. El monitoreo del crecimiento de las micobacterias es mediante la detección de la producción de CO<sub>2</sub> o el consumo de O<sub>2</sub> a través de indicadores colorimétricos o fluorométricos, uno de los sistemas más usados es el medio MGIT, en el que se detecta el crecimiento en 1 a 3 semanas <sup>(6)</sup>. 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.

### **c) NAAT**

Los estudios de amplificación de ácidos nucleicos son métodos para la detección directa de DNA de *M. tuberculosis* en muestras clínicas. La sensibilidad de la NAAT 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% <sup>(7)</sup>. El sistema *The Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test* (MTD) fue aprobado para su uso con muestras respiratorias con baciloscopia positiva y posteriormente para su uso en muestras respiratorias de pacientes con

sospecha de tuberculosis con baciloscopia negativa <sup>(22)</sup>. Además, el sistema Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor) también fue aprobado. 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 <sup>(13, 18)</sup>. Tanto MTD como Amplicor permite diferenciar *M. tuberculosis* de otras micobacterias no tuberculosas.

Hunt y cols. describieron por primera vez, en 1994, el uso de NAAT para la detección simultánea de MTB y la resistencia a rifampicina <sup>(23)</sup>. 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 <sup>(3, 11, 21)</sup>. 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). Posteriormente Boehme y cols., llevaron a cabo los primeros dos estudios clínicos multicéntricos en los que se evaluó el desempeño del sistema Xpert MTB/RIF en muestras respiratorias. En el primero 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, 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 con baciloscopia positiva y negativa respectivamente <sup>(19, 20)</sup>. Posterior a esta publicación, la OMS avaló el uso del sistema Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de TBP en adultos y niños <sup>(6)</sup>. En un metanálisis publicado en 2012, el cual incluyó 18 estudios y 10,224 muestras, emplearon el sistema Xpert MTB/RIF, el cual reportó una 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% <sup>(8)</sup>. Otro metanálisis del 2013, 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 <sup>(9)</sup>.

#### d) Xpert MTB/RIF y TBE

Existen pocos estudios que han evaluado la utilidad de Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de TBE. 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%<sup>(13, 14, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30)</sup>. La variación de la Se presentada se ha atribuido a las diferencias en las características de las poblaciones, 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. Se ha sugerido realizar centrifugación de la muestra antes del procesamiento de la misma con la finalidad de aumentar el rendimiento diagnóstico<sup>(25)</sup>. En la siguiente tabla se muestra una descripción de los estudios mencionados.

	País	Muestra (+)	Muestra (-)	Tipo de muestra (+)	Estándar de referencia	Se de Xpert MTB/RIF (95% IC)	Se de Xpert MTB/RIF (95% IC)
<b>Causse y cols.</b> <sup>(13)</sup>	y España	41	299	Ganglio 16 LCR 6 Liq. pleural 4 Absceso 5	Cultivo	95.1% (83.5-99.4)	100% (98.8-100)
<b>Armand cols.</b> <sup>(14)</sup>	y Francia	37	0	Ganglio 18 Hueso 6 Liq. pleural 7 Absceso 5	Cultivo	53.1% (34.7-70.9)	ND
<b>Zeka y cols.</b> <sup>(24)</sup>	Turquía	48	128	ND	Cultivo o cuadro clínico o radiología o histopatología	54.2% (40.3-67.4)	100% (97.2-100)
<b>Vadwai cols.</b> <sup>(25)</sup>	y India	283	250	Biopsias 105 Exudado 98 LCR 1	Constructo diagnóstico de baciloscopia, cultivo, cuadro clínico, radiología e histopatología.	80.6 % (75.5-85)	99.6% (97.8-100)
<b>Ligthelm cols.</b> <sup>(26)</sup>	y Sudáfrica	30	18	Ganglio 30	Histopatología + baciloscopia ± cultivo	96.6% (86.6-100)	88.9% (69.6-100)
<b>Moure y cols.</b> <sup>(27)</sup>	España	108	41	Ganglio 34 Liq. pleural 26 LCR 2	Cultivo	58.3% (48.5-67.8)	100% (91.4-100)
<b>Friedrich cols.</b> <sup>(28)</sup>	y Sudáfrica	20	5	Liq. pleural	Cultivo	25% (8.7-49.1)	100% (47.8-100)
<b>Hilleman cols.</b> <sup>(29)</sup>	y Alemania	45	450	Biopsias 30 Orina 5 Heces 2	Cultivo	77.3% (60.5-87.1)	98.2% (96-98.9)
<b>Tortoli y cols.</b> <sup>(30)</sup>	Italia	268	1206	Biopsias 94 Exudado 55 LCR 14 Liq. pleural 18	Cultivo o radiología o histopatología	81.3% (76.2-85.8)	99.8% (99.4-100)

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<sup>(5, 10)</sup>. 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; posteriormente en el 2013 en LCR, y otros tejidos no respiratorios (ganglios linfáticos y biopsias pleurales) <sup>(6)</sup>. Otra de las ventajas que presenta el sistema Xpert MTB/RIF es la capacidad de detectar resistencia a rifampicina, sobre todo en los casos de pacientes previamente tratados en los cuales la resistencia a INH y RIF es de 13% a 17% <sup>(32, 33)</sup>.

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.

### **3 Definición del problema**

La TB se considera una enfermedad frecuente en México, hasta un 20% se manifiesta de forma extrapulmonar, lo cual se asocia a una mayor mortalidad. Esto es debido a factores del huésped y al retraso en el diagnóstico e inicio en el tratamiento, los cuales impactan de manera negativa en el pronóstico del paciente. Desafortunadamente, las herramientas diagnósticas disponibles actualmente, tienen un pobre desempeño y en pocas ocasiones modifican la conducta terapéutica inicial. Al mismo tiempo la plataforma Xpert MTB/RIF no ha sido suficientemente estudiada en muestras extrapulmonares.

### **4 Justificación**

Por el momento no hay métodos diagnósticos ideales para la TB, cada uno de ellos posee ventajas y limitaciones. Los estándares internacionales para el diagnóstico y tratamiento <sup>(9)</sup>, indican que en todo paciente con sospecha de TBE se debe colectar una muestra adecuada para microscopía, cultivo y estudio histopatológico, esto debido a que solamente un 5 a 10% son positivas para tinción ZN, y en ocasiones será necesario iniciar el tratamiento antibiótico.

En México, un 15.3% de las defunciones causadas por la TB en el 2009 <sup>(3)</sup>, corresponden a patología extrapulmonar y donde la baciloscopía 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 <sup>(9)</sup>.

La información respecto al desempeño del sistema Xpert MTB/RIF para el diagnóstico de TBE es escasa e incluyen pocos casos de meningitis tuberculosa, la cual es considerada la

forma más grave de afección. Ha demostrado ventajas en el diagnóstico y tratamiento temprano de la TBP, las cuales de ser aplicables a los casos de TBE permitiría mejorar el pronóstico.

## **5 Objetivos**

### **c) Objetivo general**

- Comparar la sensibilidad y especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos mediante el sistema Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de TBE considerando al cultivo de micobacterias como método de referencia.

### **b) Objetivos específicos**

- Comparar la sensibilidad y especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos mediante el sistema Xpert MPTB/RIF en LCR para el diagnóstico de TB meníngea considerando al cultivo de micobacterias como método de referencia.
- Comparar la sensibilidad y especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos mediante el sistema Xpert MTB/RIF en tejidos de biopsias, abscesos y líquidos para el diagnóstico de TBE considerando al cultivo de micobacterias como método de referencia.
- Describir factores inherentes al paciente que modifican el desempeño del sistema Xpert MTB/RIF.
- Describir la correlación entre la resistencia a rifampicina demostrada por el sistema de Xpert MTB/RIF y la resistencia demostrada por el laboratorio de microbiología.

## **6 Metodología**

### **a) Diseño del estudio**

Se realizará un estudio de prueba diagnóstica, en el cual se calculará la Se y Es del sistema Xpert MTB/RIF considerando el cultivo de micobacterias como método de referencia y de manera exploratoria se usará un constructo diagnóstico basado en los datos clínicos (síntomatología, tiempo de evolución, resultado de estudios radiográficos y de otros estudios de laboratorio) recabados de manera retrospectiva de los expedientes a los que se tenga acceso.

### **b) Población de estudio**

- **Criterios de inclusión**

Todas las muestras no respiratorias de pacientes con sospecha de TBE, que hayan sido incluidas en el protocolo de evaluación del sistema Xpert MTB/RIF en el laboratorio de microbiología clínica del INCMNSZ en un periodo comprendido del 2012 al 2016.

- **Criterios de exclusión**

Muestras en las que no se haya realizado cultivo.

- **Criterios de eliminación**

Muestras que tengan resultado inválido en la prueba de biología molecular y/o datos clínicos insuficientes.

### **c) Variables**

- **Positividad de cultivo de micobacterias**

Definido como crecimiento de micobacterias del CMTB en cultivo sólido o líquido en un periodo comprendido de 8 semanas a partir de la fecha de incubación.

- **Positividad del 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.

- **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.

### **d) Análisis estadístico**

Las variables cualitativas dicotómicas se expresaron en frecuencias y porcentaje. Las variables continuas se expresaron en medianas e intervalos intercuantílicos. Para el análisis inferencial se realizó un modelo bivariado por medio de la prueba de Chi<sup>2</sup> 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.

## e) Metodología de laboratorio

### • Digestión y descontaminación de la muestra (excepto LCR), y tinción de ZN

Se realizó por el método NALC-NaOH, cada muestra se trató con 5 ml de éste (0.8 g / 150ml) 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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 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 con la tinción Auramina-Rodamina (AR). Si se observaba la presencia de bacilos, el frotis se aplicó la tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR. Por otro lado, el sedimento restante se neutralizó con amortiguador de fosfatos hasta ajustar a pH 7.

### • Cultivo

Con el sedimento mencionado, se inoculó 0.5 ml en medio sólido LJ y 0.5 ml en medio líquido MGIT, posteriormente los medios sólidos se incubaron a 37 °C con 7.5%  $\text{CO}_2$  durante 8 semanas y el medio líquido se incubó en el instrumento MGIT 960 a 37°C durante 56 días. Con el desarrollo del cultivo en LJ, se realizó tinción con ZN, para búsqueda de BAAR. A partir del medio MGIT positivo, se realizó la identificación del CMTB.

### • Sistema Xpert MTB/RIF

Se utilizó el equipo Xpert MTB/RIF para la reacción de amplificación.

## 7 Resultados

### 7.1 Población de estudio

En el período comprendido entre el año 2012 al 2016 se incluyeron 1134 muestras, de las cuales 738 fueron de líquido cefalorraquídeo, 337 de tejidos y abscesos, y 59 de líquidos corporales. Los datos clínicos se obtuvieron de los expedientes de 452 casos (Tabla 1).

TABLA 1. Tipo de muestras analizadas

TIPO DE MUESTRA	n	(%)
LCR	738	65.08 %
Biopsia de ganglio	78	6.88 %

Biopsia de piel	50	4.41 %
Biopsia de pulmón	39	3.44 %
Absceso	32	2.82 %
Biopsia de hígado	19	1.68 %
Biopsia de colon	15	1.32 %

Biopsia de íleon	13	1.15 %
Biopsia pleural	12	1.06 %
Biopsia de hueso/vértebra	10	0.88 %
Biopsia pericardio	7	0.62 %
Biopsia de bazo	5	0.44 %
Biopsia epiplón	5	0.44 %
Biopsia cerebro	4	0.35 %
Biopsia sinovial	3	0.26 %

Biopsia recto	2	0.18 %
Biopsia mediastino	2	0.18 %
Biopsia mucosa	1	0.09 %
Biopsia capsula articular	1	0.09 %
Biopsia vejiga	1	0.09 %
Biopsia vesícula	1	0.09 %
Biopsia no clasificable	33	2.91 %
Líquido pleural	32	2.82 %
Líquido de ascitis	18	1.59 %
Orina	4	0.35 %
Líquido pericárdico	3	0.26 %
Líquido sinovial	1	0.09 %
Humor acuoso	1	0.09 %
TOTAL	1134	

TIPO DE MUESTRA	n	(%)
Biopsia renal	2	0.18 %
Biopsia yeyuno	2	0.18 %

## 7.2 Características sociodemográficas de la población

De los datos clínicos obtenidos de los 452 expedientes, la mediana de edad fue de 41 años (RIC 30-56), la mediana de peso fue 60 kg (RIC 53-70.5). Respecto a las comorbilidades presentes en la población estudiada, se observó que el 17% padecía diabetes mellitus, el 12% padecía lupus eritematoso generalizado (LEG), el 6% padecía artritis reumatoide (AR) y otro 6% presentaba enfermedad renal crónica (ERC) KDIGO G5. El 22% de los pacientes tiene infección por VIH, de los cuales el 80% se encontraba en estadio clínico C1, C2 o C3 y sólo el 36% recibía tratamiento antirretroviral. Se observó que un 26% de la población estudiada se encontraba bajo tratamiento con esteroides de manera crónica por diversos motivos (Tabla 2 y 3).

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

Características	n/n	(%)
Edad, mediana (RIC)	41	(30-56)
Peso, mediana (RIC)	60	(53-70.5)
Comorbilidades		
Diabetes mellitus	76/442	17.19
LEG	54/443	12.19

AR	26/441	5.9
Trasplante de órgano sólido	25/443	5.64
Trasplante de médula ósea	5/442	1.13
Otra enf. de tejido conectivo	16/311	5.14
ERC (TFG <15 ml/min)	27/440	6.14
VIH +	99/443	22.35
Consumo de esteroides	117/442	26.47

TABLA 3. Resultados de las características demográficas de los pacientes y la relación con el resultado del sistema Xpert MTB/RIF.

Características	Xpert MTB/RIF + n/n (%)	Xpert MTB/RIF - n/n (%)	P
Edad, mediana (RIC)	43.5 (32.5-49)	41 (30-57)	0.79
Peso, mediana (RIC)	61 (53-69.5)	60 (53-70.8)	0.96
Comorbilidades			
Diabetes mellitus	4/16 (25)	72/426 (16.9)	0.39
LEG	2/16 (12.5)	52/427 (12.18)	0.96
AR	0/16 (0)	26/425 (6.12)	0.30
Trasplante de órgano sólido	0/16 (0)	25/427 (5.85)	0.31
Trasplante de médula ósea	0/16 (0)	5/426 (1.17)	0.66
Otra enf. de tejido conectivo	3/13 (23.08)	13/298 (4.36)	0.03
ERC (TFG <15 ml/min)	2/16 (12.5)	25/424 (5.9)	0.28
VIH +	7/16 (43.75)	92/427 (21.55)	0.036
Consumo de esteroides	4/16 (25)	113/426 (26.53)	0.89

### 7.3 Características de los pacientes con VIH

De los casos revisados, 99 (22.35%) tenían infección por VIH, siendo éstos una población importante del estudio (Tabla 4 y 5).

TABLA 4. Resultados de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH.

Características	n/n	(%)
Número de pacientes	99/443	22.35

En tratamiento antirretroviral	67/184	36.41
Estadio clínico		
A	9/78	11.54
B	7/78	8.97
C	62/78	79.49

TABLA 5. Resultados de las características clínicas de los pacientes con infección por VIH y la relación con el resultado del sistema Xpert MTB/RIF.

Características	Xpert MTB/RIF + n/n (%)	Xpert MTB/RIF - n/n (%)	p
Número de pacientes	7/16 (43.75)	92/427 (21.55)	0.036
En tratamiento antirretroviral	5/8 (62.5)	62/176 (35.23)	0.11
Estadio clínico			
A	0/6 (0)	9/72 (12.5)	0.55
B	1/6 (16.67)	6/72 (8.33)	0.55
C	5/6 (83.33)	57/72 (79.17)	0.55

#### 7.4 Características de los pacientes con sospecha de neuroinfección

De los 452 expedientes revisados, 338 casos (75%) tenían sospecha de afección al sistema nervioso central (SNC), con las características clínicas principalmente de fiebre en un 47%, cefalea en un 45% y con datos de focalización en un 32%. De los LCR analizados se midieron diversas variables cuantitativas (Tabla 6 y 7).

TABLA 6. Resultado de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección.

Características	n/n	(%)
Sospecha a afección a SNC	338/452	74.78
Fiebre	137/293	46.76
Cefalea	143/320	44.69
Datos de focalización	101/312	32.37

TABLA 7. Resultado de las características clínicas de los pacientes con sospecha de neuroinfección y la relación con el resultado del sistema Xpert MTB/RIF.

Características	Xpert MTB/RIF + n/n (%)	Xpert MTB/RIF - n/n (%)	p
Sospecha a afección a SNC	7/16 (43.75)	331/432 (76.62)	0.003
Fiebre	2/5 (40)	135/288 (46.88)	0.76
Cefalea	2/7 (28.57)	141/313 (45.05)	0.38
Datos de focalización	2/7 (28.57)	99/305 (32.46)	0.82
Punción lumbar			
Leucocitos, <b>mediana (RIC)</b>	0 (0-5)	2 (0-10)	0.68
Glucosa, <b>mediana (RIC)</b>	66 (37-70.3)	58 (47-68.4)	0.88
Proteínas, <b>mediana (RIC)</b>	54 (19-200)	49 (33-85)	0.93
Lactato, <b>mediana (RIC)</b>	7.5 (7.5-7.5)	2.3 (1.8-7.4)	0.38

### 7.5 Determinación de la sensibilidad y especificidad por tipo de muestra.

Se encontró una sensibilidad global del sistema Xpert MTB/RIF del 58.57% (IC 46.17% - 70.23%) y una especificidad del 96.52 % (IC 95.24% - 97.54%), así como un valor predictivo positivo (VPP) de 52.56% (IC 40.93% - 63.99%), y un valor predictivo negativo (VPN) de 97.25% (IC 96.08% - 98.15%). Para el diagnóstico de meningitis tuberculosa por LCR mediante el sistema Xpert MTB/RIF se reportó una Se de 52.63% (IC 28.86% - 75.55%), una Es de 98.33% (97.10% - 99.13%). En tejidos y abscesos se encontró una Se del 68.89% (IC 53.35% - 81.83%) y Es 91.78% (IC 88.02% - 94.66%). En especímenes líquidos una Se 0% (0.0% - 45.93%) y una Es 98.11% (IC 89.93% - 99.95%), (Tabla 8).

TABLA 8. Sensibilidad y especificidad del sistema Xpert MTB/RIF

	Xpert MTB/RIF	
	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
TOTAL	58.57% (IC 46.17% - 70.23%)	96.52 % (IC 95.24% - 97.54%)
LCR	52.63% (IC 28.86% - 75.55%)	98.33% (97.10% - 99.13%)
Tejidos y abscesos	68.89% (IC 53.35% - 81.83%)	91.78% (IC 88.02% - 94.66%)

Líquidos	0% (0.0% - 45.93%)	98.11% (IC 89.93% - 99.95%)
----------	--------------------	-----------------------------

## 8 Discusión

En este estudio de prueba diagnóstica del sistema Xpert MTB/RIF en un hospital de tercer nivel en México, se describió la sensibilidad y especificidad que se encontró en comparación al estándar de oro que es el cultivo.

Este estudio demostró una Se de 58.57% (IC 46.17% - 70.23%) y Es 96.52 % (IC 95.24% - 97.54%) en muestras de origen extrapulmonar en un total de 1134 muestras, de las cuales más del 50% fueron de LCR, el restante fue de biopsias, abscesos y otros líquidos.

La Se y Es reportada en este estudio es similar a otros como el publicado en el 2014 por Govind y cols. en Sudáfrica donde se encontró una Se de 71.6% y Es 94%, así como un VPP 64.5% y VPN 95.7% <sup>(37)</sup>. En un meta-análisis en el cual se incluyó 18 estudios y 4461 muestras, se observó una diferencia en la sensibilidad entre los diferentes tipos de muestras, observándose una Se de 83.1% (IC 71.4% - 90.7%) para el sistema Xpert comparado con el cultivo en ganglios linfáticos y otros tejidos, mientras que en el LCR se reportó una Se de 80.5% (IC 59% - 92.2%) y en líquido pleural de 46.4% (IC 26.3% - 67.8%) <sup>(38)</sup>. En otra revisión donde se analizó 6,026 muestras no respiratorias de un total de 23 estudios, en el cual se comparó el sistema Xpert y el cultivo, se obtuvo una Se muy heterogénea con una mediana de Se de 83% (IC 68% - 94%), mientras que las especificidades fueron típicamente muy alta con una mediana de 98% (IC 89% - 100%) <sup>(39)</sup>.

En otro estudio realizado en España se observó que la Se era baja en localizaciones estériles como el líquido pleural (26.9%) comparada con muestras no líquidas como abscesos <sup>(40)</sup>.

En este estudio se encontró 22 muestras de LCR positivas con el sistema Xpert MTB/RIF de un total de 738, lo cual corresponde a un total de 3% del total de muestras analizadas. Se reportó una Se para el diagnóstico de meningitis tuberculosa por LCR mediante el sistema Xpert MTB/RIF de 52.63% (IC 28.86% - 75.55%) y una Es de 98.33% (97.10% - 99.13%), similar a otros estudios <sup>(38)</sup>.

En este estudio en el grupo de muestras de tejidos y abscesos se encontró una Se del 68.89% (IC 53.35% - 81.83%) y Es 91.78% (IC 88.02% - 94.66%), mientras que en un meta-análisis en el que se incluyó 18 estudios se reportó una Se de 83.1%.

Respecto a la muestras de líquidos (pleural, ascitis, pericárdico, sinovial, orina y humor acuoso) en este estudio el rendimiento diagnóstico fue bajo con una Se 0% (0.0% - 45.93%) y una Es 98.11% (IC 89.93% - 99.95%).

La simplicidad del sistema Xpert MTB/RIF, así como su rapidez es una ventaja sobre otros estudios diagnósticos.

## **9 Conclusiones**

La sensibilidad y especificidad del sistema Xpert MTB/RIF reportada en este estudio es similar a las que se han encontrado en otros estudios, por lo que ésta prueba la hace una herramienta diagnóstica adecuada para el diagnóstico de TBE.

La sensibilidad en muestras de tejidos y abscesos con el sistema Xpert MTB/RIF fue mayor comparación con el LCR y otros líquidos estériles.

## 10 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 2015.
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. SINAVE. Perfil epidemiológico de la Tuberculosis en México. 2012.
5. WHO. Treatment of tuberculosis: guidelines 4th ed.
6. WHO. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. 2013.
7. Barnes PF. "Rapid diagnostic tests for tuberculosis: progress but no gold standard." *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 May; 155(5):1497-8.
8. 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.
9. 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.
10. WHO. International standards for tuberculosis care. 2006
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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 non respiratory specimens." *J Clin Microbiol.* 2011 May; 49(5):1772-6.
15. 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.

16. 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.
17. 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*. 9<sup>th</sup> edition. Washington, D.C. : ASM Press, 2007.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.

27. 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.
28. 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.
29. Hillemann D, Rüsç-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.
30. 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.
31. Thwaites GE, Chau TT, Farrar JJ. "Improving the bacteriological diagnosis of tuberculous meningitis." *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):378-9.
32. Ormerod LP. "Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment." *Br Med Bull.* 2005 Jun 14;73-74:17-24
33. Faustini A, Hall AJ, Perucci CA. "Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review." *Thorax.* 2006 Feb; 61(2):158-63.
34. Ogawa SK, Smith MA, Brennessel DJ, et al. "Tuberculous meningitis in an urban medical center." *Medicine (Baltimore).* 1987 Jul; 66(4):317-26.
35. Stewart S. "The bacteriological diagnosis of tuberculous meningitis." *J Clin Pathol.* 1953 Aug;6(3):241-2.
36. 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.
37. Govind C. N., K. Moodley. Diagnosis of extrapulmonary TB: Experience with the Xpert MTB/RIF assay. *International Journal of Infectious Diseases* 21S (2014) 1–460.
38. Denkinger Claudia M., Schumacher Samuel G. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2014; 44: 435–446.

39. Maynard-Smith Laura, Larke Natasha. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples: a systematic review. *BMC Infectious Diseases* (2014) 14:709
40. Moure Raquel, Martín Rogelio. 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. *Journal of Clinical Microbiology* p. 513–515.