



# Evaluación de la prueba GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la resistencia a rifampicina en muestras extrapulmonares

Gustavo Barriga Angulo,\* Margarita Solís Trejo,\* Alejandra Aceves Rosas,\*  
 Laura López Álvarez,\* Faustina Ramírez Cruz,\* María Elsa Monzalvo Hernández,\*  
 Eva Aurora Hernández Sánchez,\* Carlos Arumir Escorza\*

## Palabras clave:

Diagnóstico rápido de tuberculosis, resistencia a rifampicina, diagnóstico molecular de tuberculosis, reacción en cadena de la ADN polimerasa, meningitis tuberculosa, prueba de GeneXpert.

## Key words:

Rapid diagnosis of tuberculosis, rifampin resistance, molecular diagnosis of tuberculosis, polymerase chain reaction, meningeal tuberculosis, GeneXpert test.

\* Laboratorio Clínico «Dr. Pablo Mendoza Hernández», Hospital de Infectología. Centro Médico Nacional «La Raza». Instituto Mexicano del Seguro Social.

Recibido:  
19/06/2014.  
Aceptado:  
30/06/2014.

## RESUMEN

**Introducción:** De acuerdo con los reportes en la literatura mundial, el diagnóstico etiológico de las localizaciones extrapulmonares de tuberculosis se realiza con muy baja frecuencia; de ellas, la forma meníngea –que es una de las más frecuentes– requiere de un diagnóstico y tratamiento tempranos debido a su elevada mortalidad y secuelas neurológicas. En este estudio, se presenta la experiencia obtenida en el análisis comparativo del empleo de una prueba rápida de reacción en cadena de la polimerasa y de resistencia a rifampicina (GeneXpert MTB/RIF)<sup>MR</sup> con técnicas convencionales de tinción, cultivo, tipificación y sensibilidad antimicrobiana en 693 pacientes con sospecha clínica de tuberculosis extrapulmonar, principalmente meníngea. **Material y métodos:** Se llevó a cabo un estudio comparativo de los resultados obtenidos en el análisis de 693 muestras provenientes del mismo número de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis de localización extrapulmonar utilizando una técnica rápida de reacción en cadena de la polimerasa y de sensibilidad a la rifampicina (GeneXpert MTB/RIF)<sup>MR</sup> y las técnicas de frotis y tinción Ziehl-Neelsen, cultivo Lowestein Jensen (BioMerieux), MGIT (Becton Dickinson), tipificación Gen Probe (Accuprobe), Genotype MTBRD (Hain Lifescience) y sensibilidad antimicrobiana MGIT (Becton Dickinson) y Genotype MTBRD (Hain Lifescience). **Resultados:** La mayor parte de las muestras estudiadas correspondió a líquidos cefalorraquídeos, seguida de líquidos pleurales. Ciento una muestras fueron positivas por cultivo, 74 de los aislamientos correspondió al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, 22 a *Mycobacterium avium* y cinco a *Mycobacterium kansasii*. El método más sensible fue el cultivo en el medio de MGIT (86.12%), seguido de la prueba GeneXpert (73.2%). Ninguna de las cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mostró resistencia a rifampicina ni a ninguno de los antimicrobianos evaluados. El tiempo promedio para la obtención de resultados

## ABSTRACT

**Introduction:** In most cases of extrapulmonary tuberculosis, its etiological diagnosis is very seldom accomplished. The meningeal form of tuberculosis requires an early diagnosis and treatment because of its high rate of mortality and neurological sequelae. In this study, we report the results obtained with the use of a polymerase chain reaction and rifampin resistance technique (GeneXpert MTB/RIF)<sup>TM</sup> in 693 patients with the presumptive diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, in comparison with the conventional techniques of stains, culture, tipification and antimicrobial susceptibility. **Material and methods:** We make a retrospective analysis of the results obtained in 693 samples of the same number of patients with presumptive clinical diagnosis of tuberculosis using the Ziehl-Neelsen stain technique, two culture media: Lowestein Jensen (BioMerieux) and Middlebrook broth base 7H9 (MGIT Becton Dickinson), two tipification techniques: Gen Probe (Accuprobe), Genotype MTBRD (Hain Lifescience), two antimicrobial susceptibility methods: Genotype MTBRD (Hain Lifescience), MGIT (Becton Dickinson) and a rapid technique of polymerase chain reaction and rifampin resistance (GeneXpert MTB/RIF) (Cepheid), in the lapse of five years. **Results:** Most of the samples studied correspond to CSF and pleural effusions. 101 samples were positive by culture. 74 of the isolations correspond to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, 22 to *Mycobacterium avium*, and five to *Mycobacterium kansasii*. The most sensitive method was the culture in the MGIT medium (86.12%), followed by the technique of GeneXpert (73.2%). None of the strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex showed resistance to rifampin or to the other antimicrobials studied. The mean time for the obtention of a positive result was 34 days for the culture in the Lowestein Jensen media, 14 for the MGIT media, and 2.5 hours for the GeneXpert test. **Conclusions:** The GeneXpert MTB/RIF Test<sup>TM</sup> used in the study of 693 patients with the presumptive diagnosis of extrapulmonary

## Correspondencia:

Dr. Gustavo Barriga Angulo.  
Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional «La Raza», Laboratorio Clínico, Circuito Interior S/N y Seris  
Col. La Raza, 23990, Del. Azcapotzalco, México, D.F.  
Tel. 57245900, ext. 23925.  
E-mail: gustavo.barriga@imss.gob.mx

positivos fue de 34 días para el medio de Lowestein Jensen, 14 días para el medio de MGIT y 2.5 horas para la prueba de GeneXpert. **Conclusiones:** La prueba de GeneXpert MTB/RIF utilizada en el estudio de 693 pacientes con diagnóstico clínico de probable tuberculosis extrapulmonar mostró como ventajas sobre las otras técnicas utilizadas menor tiempo para la obtención de resultados positivos (horas versus días), sensibilidad y especificidad elevadas, simplicidad de la técnica, y determinación adicional de resistencia a rifampicina; como desventajas: no detectar a micobacterias de especies diferentes a las del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (26.8% de los casos positivos por cultivo) y su elevado costo

*tuberculosis showed numerous advantages over the conventional techniques: shorter time of obtention of results (hours versus days). High sensitivity (73.2%) and specificity (100%) –its sensitivity, considering only the isolations of Mycobacterium tuberculosis complex, was 100%–, the additional determination of rifampin resistance, and its technical simplicity. Its disadvantages were: no detection of strains other than the Mycobacterium tuberculosis complex (26.8% of the cases) and its high cost.*

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, la tuberculosis a nivel mundial representó la segunda causa de muerte por agentes infecciosos en el año 2011; 8.7 millones de personas enfermaron y 1.4 millones murieron por esta causa.<sup>1</sup> En nuestro país, de acuerdo con los datos del CENAPRECE,<sup>2</sup> en ese año se registraron 19,445 nuevos casos en todas sus formas clínicas, principalmente la pulmonar, seguida de las formas ganglionar y meníngea, con una frecuencia de 17.8 por 100 mil habitantes.

De las diversas localizaciones extrapulmonares de la tuberculosis, la meníngea es una de las más devastadoras por su elevada mortalidad y sus severas secuelas neurológicas en los que sobreviven. En numerosas publicaciones se ha señalado el hecho de que el establecimiento de su diagnóstico y tratamiento tempranos reduce notablemente su mortalidad y sus secuelas. La tuberculosis pleural es la segunda forma más frecuente de tuberculosis extrapulmonar y la causa más frecuente de derrame pleural en lugares de alta prevalencia de infección con el virus de la inmunodeficiencia humana.<sup>3-5</sup>

Los métodos convencionales utilizados para el aislamiento, identificación y determinación de susceptibilidad antimicrobiana de micobacterias son lentos, laboriosos, y requieren de procesos secuenciales complejos, equipos de alta tecnología, cabinas de bioseguridad, áreas especiales y personal altamente experimentado y capacitado. Adicionalmente, el diagnóstico de las infecciones por micobacterias en localizaciones extrapulmonares se realiza con muy baja frecuencia, debido a que la obtención de las muestras necesarias para estudio requiere de métodos invasivos, es difícil el obtener muestras adicionales y el número de micobacterias siempre es menor al encontrado en muestras pulmonares.<sup>6</sup>

El propósito de este trabajo es dar a conocer la experiencia obtenida en el estudio de 693 probables casos de tuberculosis extrapulmonar en pacientes atendidos en los cuatro hospitales del Centro Médico «La Raza» del Instituto Mexicano del Seguro Social utilizando una técnica rápida de reacción en cadena de la polimerasa y resistencia a la Rifampicina (GeneXpert MTB/RIF), en comparación con las técnicas convencionales de tinción, cultivo, tipificación y sensibilidad antimicrobiana, y las sensibilidades, especificidades y valores predictivos obtenidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un análisis retrospectivo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos obtenidos con una técnica rápida de reacción en cadena de la polimerasa y de resistencia a la rifampicina (GeneXpert MTB/RIF), en relación con las técnicas convencionales de tinción Ziehl-Neelsen, cultivo Lowestein Jensen (Biomerieux), caldo base 7H9 Middlebrook (MGIT, Becton Dickinson), tipificación Accuprobe (Gen Probe) y Genotype MTBRD (Hain Lifescience), y susceptibilidad antimicrobiana MGIT (Becton Dickinson) y Genotype MTBRD (Hain Lifescience), en 693 muestras de origen extrapulmonar (*cuadro 1*) provenientes del mismo número de pacientes con sospecha clínica de infección por micobacterias, de los cuatro hospitales del Centro Médico Nacional «La Raza» del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el lapso de cinco años (2009-2013).

Para la obtención, envío y procesamiento de las muestras estudiadas se utilizaron los criterios y medidas de seguridad recomendados por la Organización Mundial de la Salud,<sup>7</sup> la Organización Sanitaria Panamericana,<sup>8</sup> el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la

Secretaría de Salud,<sup>9</sup> el Centro de Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos de Norteamérica,<sup>10,11</sup> el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México<sup>12</sup> y la Asociación Americana de Microbiología,<sup>13</sup> y se llevaron a cabo los procedimientos recomendados por la Organización Mundial de la Salud.<sup>14</sup>

Las muestras para estudio en un volumen de 700 microlitros se colocaron en tubos cónicos estériles de poliestireno de 15 mililitros libres de enzimas inhibidoras de ácidos nucleicos; se les añadieron 1,500 microlitros de solución de lisis, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, agitándolos con un vórtex en tres ocasiones cada cinco minutos, después de lo cual el contenido se transfirió a un cartucho de prueba, mismo que se colocó en el equipo para su procesamiento y lectura automáticos.

## RESULTADOS

De los 693 pacientes estudiados, 363 correspondieron al sexo masculino (52.3%) y 330 al femenino (47.7%). La mayor parte de las muestras estudiadas correspondieron a líquido cefalorraquídeo (83.2%) y líquido pleural (14.3%) (cuadro I). Se logró aislamiento por cultivo de micobacterias en 101 de los pacientes, 87 muestras en el medio

de MGIT y 68 muestras en el de Lowestein Jensen; la tinción de Ziehl-Neelsen fue positiva en 19, la prueba de GeneXpert fue positiva en 74 de las muestras. Un total de 74 de las cepas aisladas correspondió al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, 22 a *Mycobacterium avium* y cinco a *Mycobacterium kansasii* (cuadros II y III).

En el cuadro IV se muestran los valores predictivos, sensibilidad, especificidad y prevalencia obtenidos con los diferentes métodos utilizados.

Ninguna de las cepas aisladas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mostró resistencia a los antimicrobianos evaluados, lo que coincidió con los resultados obtenidos con la prueba de GeneXpert de sensibilidad a la rifampicina.

El tiempo promedio de desarrollo por cultivo de las cepas aisladas en el medio de Lowestein Jensen fue de 34 días; en el de MGIT, de 14, y con la técnica de GeneXpert, de 2.5 horas.

## COMENTARIOS

La detección y el tratamiento oportuno de pacientes con tuberculosis son la clave para su control epidemiológico; sin embargo, su diagnóstico etiológico por el laboratorio continúa representando un gran reto para los servicios de salud, debido a que los recursos necesarios para

**Cuadro I.** Muestras estudiadas.

Muestra	NE	%
Líquido cefalorraquídeo	576	83.2
Líquido pleural	99	14.3
Líquido peritoneal	8	1.2
Muestras diversas	6	0.8
Biopsias diversas	4	0.5
Total	693	100

**Cuadro II.** Porcentajes de positividad de acuerdo con el método utilizado.

Método	# +	%
Cultivo MGIT	87	12.5
GeneXpert	74	10.9
Cultivo Lowestein Jensen	68	9.8
Frotis y tinción Ziehl-Neelsen	19	2.7

**Cuadro III.** Géneros y especies aisladas por cultivo.

Microorganismos	Líquido cefalorraquídeo	Líquido pleural	Absceso renal	Total	%
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	56	17	1	74	73.2
<i>Mycobacterium avium</i>	21	1	0	22	21.7
<i>Mycobacterium kansasii</i>	5	0	0	5	5.1
Totales	82	18	1	101	100

**Cuadro IV.** Sensibilidad, especificidad, prevalencia y valores predictivos de cuatro pruebas utilizadas en el diagnóstico de 693 casos probables de tuberculosis extrapulmonar.

Parámetro	Tinción Ziehl-Neelsen	Cultivo MGIT	Cultivo Lowenstein Jensen	GeneXpert
Valor predictivo positivo (%)	100	100	100	100
Valor predictivo negativo (%)	89.16	98.05	94.57	95.64
Sensibilidad (%)	18.81	86.12	67.34	73.28
Especificidad (%)	100	100	100	100
Prevalencia (%)	14.57	14.57	14.57	14.57

lograr este objetivo no siempre están disponibles, y porque por las características particulares de los organismos causales, se requieren de días a semanas para lograr su aislamiento, caracterización y determinación de sensibilidad antimicrobiana. En el diagnóstico por el laboratorio en las localizaciones extrapulmonares de la tuberculosis, este problema es aún mayor, y se realiza con muy baja frecuencia debido a varios factores, como el hecho de que la obtención de las muestras necesarias para estudio requiere de métodos invasivos, es difícil obtener muestras adicionales, y el número de organismos siempre es menor al encontrado en las muestras pulmonares.<sup>3-6,16</sup>

La prueba de reacción en cadena de la ADN polimerasa fue el primer método disponible para amplificar secuencias de ácidos nucleicos a finales de la década de los años 80; sin embargo, su aplicación en el diagnóstico de la tuberculosis había sido muy limitado, debido principalmente a la complejidad en la extracción, amplificación y detección del ADN de micobacterias y a los riesgos de seguridad biológica inherentes a su manejo. Por otra parte, las pruebas disponibles para determinar susceptibilidad antimicrobiana son lentas, laboriosas, y requieren del empleo de equipos y reactivos sofisticados y costosos.

De las numerosas pruebas disponibles de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de tuberculosis, la prueba de GeneXpert MTB/RIF es una de las más ampliamente evaluadas y que la Organización Mundial de la Salud ha evaluado y recomendado para su empleo en la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su susceptibilidad a la rifampicina, basándose en su sensibilidad, especificidad, simplicidad técnica y rapidez.<sup>15-23</sup>

En este estudio, la prueba de GeneXpert se utilizó en 693 muestras de origen extrapulmonar, principalmente de líquido cefalorraquídeo, encontrándose una sensibilidad de 73.2% y especificidad de 100%, valor

predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 95.6%; sin embargo, si se hace la consideración de tomar en cuenta únicamente los aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, su sensibilidad correspondería al 100%, ya que 27 de los aislamientos por cultivo (26.7%) correspondieron a *Mycobacterium avium* y a *Mycobacterium kansasii*, que no son detectados por esta prueba. Otras ventajas adicionales de la misma fueron el tiempo requerido para la obtención de un resultado positivo (que fue, en promedio, de 2.5 horas, comparado con el cultivo, que varió de 14 a 34 días, dependiendo del medio de cultivo utilizado), al igual que el disponer de la sensibilidad a la rifampicina (que con los métodos tradicionales requiere de 2 a 3 semanas adicionales a partir de la obtención del aislamiento positivo por cultivo), el no requerir de personal altamente calificado técnicamente (dada la simplicidad técnica en su realización e interpretación) y la posibilidad de procesar muestras individualmente.

## AGRADECIMIENTOS

Al ingeniero Jesús Chamorro González por su apoyo para la elaboración del manuscrito.

Al Sr. Ronald Lealos por su apoyo para las traducciones al inglés.

## REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. La tuberculosis en datos y cifras. Nota descriptiva No. 107, 2013, 1-5. World Health Organization Media Centre.
2. Castellanos JM, García KMA. Situación actual de la tuberculosis en el mundo, México y Veracruz. Avances y desafíos, 2012. CENAPRECE: <http://conave.gob.mx/tuberculosis>.
3. Mars GE, Chan ER. Tuberculous meningitis, diagnosis and treatment overview. Tuberculosis Research and Treatment. 2011; 798764: 1-9.
4. Morales AJJ. Infección por micobacterias del sistema nervioso central. Bol Med Hosp Infant Mex. 2006; 63 (5): 1-15.

5. Igbal RA, Padayachae R, Paruk H, Devi HPK, Marais S, Connolly G. Diagnosis of tuberculous meningitis clinical and laboratory parameters. *International Journal of Infectious Diseases*. 2007; 81 (4): 348-354.
6. Lasso BM. Meningitis tuberculosa; claves para su diagnóstico y propuestas terapéuticas. *Rev Chil Infect*. 2011; 28 (3): 238-247.
7. Asamoah BA. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Organización Mundial de la Salud. 3a edición. Ginebra, Suiza; 2005.
8. Sequeira MP, Baron J, Balandrano S, Riquelme MC, Velazco M, Garzon TMC et al. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. 2008; (1-11). Organización Panamericana de la Salud.
9. Balandrano CS, Anzaldo FG, Contreras RA, Rosete MCR, Gutierrez CP, Corella GC. Manual de técnicas para el examen baciloscópico. Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia. Secretaría de Salud. 2003. ISBN 975-721-0834.
10. CDC. National plan for reliable tuberculosis laboratory services using a systematic approach. Recommendations from CDC and the Association of Public Health Laboratories Task Force and Laboratory Tuberculosis Services. 2005, MMWR.54.R.R.6.1-12.
11. Miller JM et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Center for Diseases Control and Prevention. 2009. HHS. Publication. CDC 21-112.
12. Camacho CR, Espitia RC, Mancilla JR, Segura JF, Castellanos RC. Manual de Procedimientos de Bioseguridad. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 2012.
13. Lynne JG. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3rd. edition. Washington DC: American Society of Microbiology; 2010. ISBN 9781555815271.
14. World Health Organization. Rapid implementation of the GeneXpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational how-to, Practical Considerations. World Health Organization WHO/HTM/tb/2011, 1-33.
15. Barriga AG. Diagnóstico de Laboratorio de la Infección por Micobacterias. Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C.PAC, *Infecto* 2, 2003, Tomo 7, Unidad 5, 839-848.
16. Millman AJ, Dowdy DW, Miller CR, Brownell R, Metcalf JZ, Cattamaunchi A et al. Rapid molecular testing for TB. A Guide to respiratory isolation in the USA. Cost-benefit analysis. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e79669, 1-8.
17. Hilleman D, Rusch GS, Doheme E, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF System. *Journal Clin Microbiol*. 2011; 40 (4): 1202-1205.
18. Friedrich JO, Ridlingmaser FG, Diacon AH. Xpert MTB/Rif assay for the diagnosis of Pleural Tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2011; 49 (12): 4341-4342.
19. Zeka AN, Tasbakar S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for the rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Journal Clin Microbiol*. 2011; 49 (12): 4138-4141.
20. Purcel JN, Palma R, Valdes GL, Bielsa J, San Jose E, Esqueda H. Xpert MTB/RIF in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis. *Inter J Tuber Lung As*. 2013; 17 (9): 1217-1219.
21. Causse M, Ruiz P, Gutierrez JRA, Casal M. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Clin Microb*. 2011; 49 (8): 3065-3067.
22. Nguyen TQN, Auewkerk D, Dang AT, Tran THCh, Nguyen TMM, Ho OTN et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the diagnosis of tuberculous meningitis. *Jour Clin Microb*. 2013; 52 (1): 220-232.
23. Piatek AS, Van Cleef M, Alexander H, Coggier WL, Rehr N, Varkanger Shinnich TM et al. GeneXpert for TB diagnosis planned and purposeful implementation. *Glob Health Sci Pract*. 2012; 1 (1): 18-23.