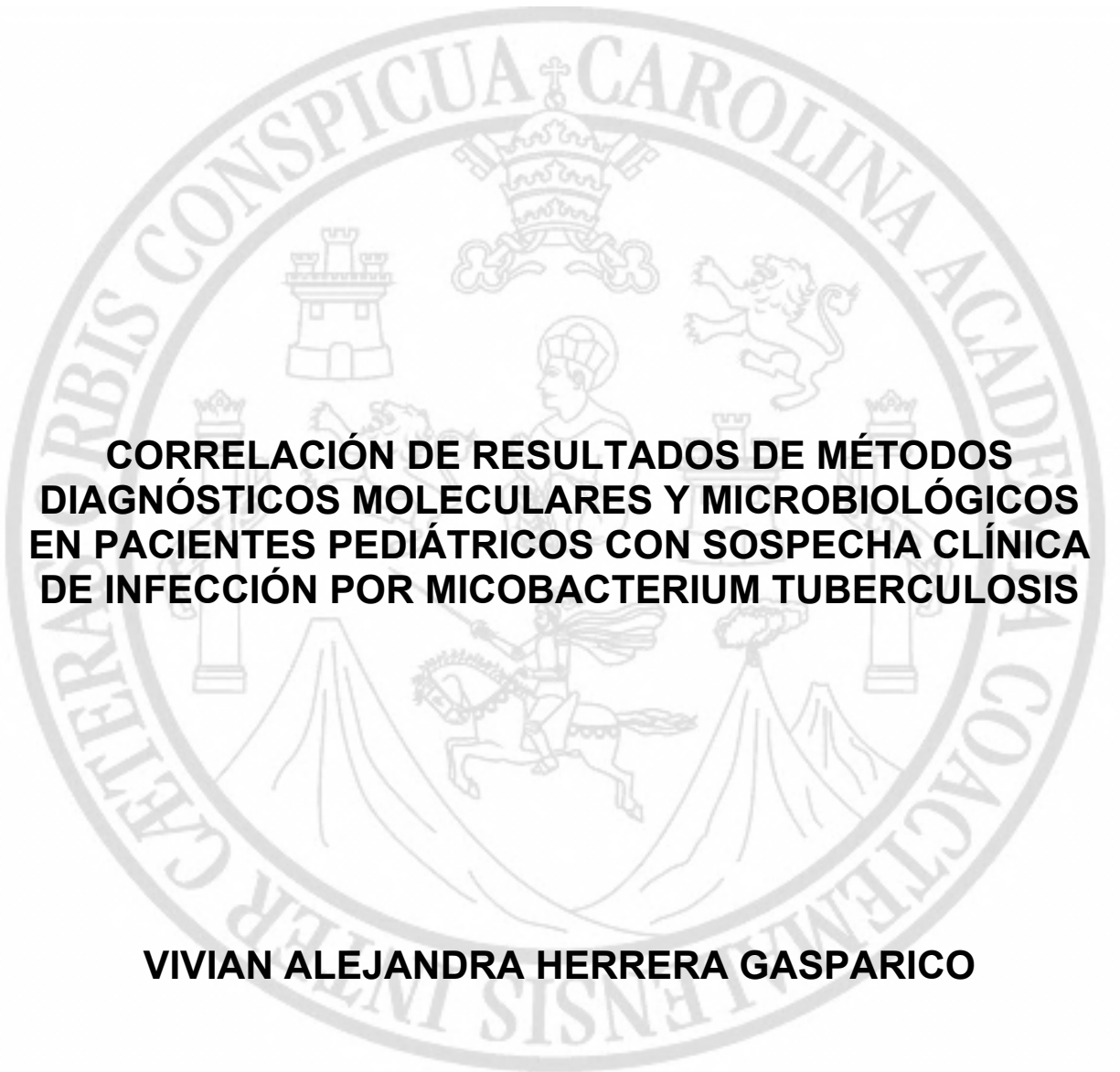


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS  
DIAGNÓSTICOS MOLECULARES Y MICROBIOLÓGICOS  
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA CLÍNICA  
DE INFECCIÓN POR MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**VIVIAN ALEJANDRA HERRERA GASPARICO**

**Tesis**

**Presentada ante las autoridades de la  
Escuela de Estudios de Postgrado de la  
Facultad de Ciencias Médicas**

**Maestría en Ciencias Médicas con Especialidad en Patología con Énfasis En Patología Anatómica y Clínica  
Para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Médicas con Especialidad en Patología con Énfasis En Patología Anatómica y Clínica**

**Julio 2021**



# Facultad de Ciencias Médicas

## Universidad de San Carlos de Guatemala

PME.OI.312.2021

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

### HACE CONSTAR QUE:

El (la) Doctor(a): Vivian Alejandra Herrera Gasparico

Registro Académico No.: 200410098

No. de CUI : 2377399170101

Ha presentado, para su EXAMEN PÚBLICO DE TESIS, previo a otorgar el grado de Maestro(a) en Ciencias Médicas con Especialidad en **Patología con Énfasis en Patología Anatómica y Clínica**, el trabajo de TESIS **CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA CLÍNICA DE INFECCIÓN POR MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS.**

Que fue asesorado por: Dr. Orlando Rodas Pernillo, MSc.

Y revisado por: Dr. Eddy René Rodríguez, MSc.

Quienes lo avalan y han firmado conformes, por lo que se emite, la ORDEN DE IMPRESIÓN para **Julio 2021**

Guatemala, 03 de junio de 2021.

JUNIO 6, 2021

Dr. Rigoberto Velásquez Paz, MSc.  
Director  
Escuela de Estudios de Postgrado

Dr. José Arnoldo Saenz Morales, MA. ★  
Coordinador General  
Programa de Maestrías y Especialidades



/dlsr

Guatemala, 23 de febrero de 2021

Doctor  
**OSCAR LEONEL MORALES ESTRADA, MSc.**  
Coordinador Específico  
Programa de Maestrías y Especialidades  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente

Respetable Dr. Morales:

Por este medio, informo que he asesorado a fondo el informe final de graduación que presenta la doctorea **VIVIAN ALEJANDRA HERRERA GASPARICO, carné No. 200410098** de la carrera de Maestría en Ciencias Médicas con Especialidad en Patología Con Énfasis En Patología Clínica y Anatómica el cual se titula: **“CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES, Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA CLÍNICA DE INFECCIÓN POR MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS”**.

Luego de la asesoría, hago constar que la Dra. **HERRERA GASPARICO** ha concluido las sugerencias dadas para el enriquecimiento del trabajo. Por lo anterior, emito el **dictamen positivo** sobre dicho trabajo y confirmo que está listo para pasar a revisión de la Unidad de Tesis de la Escuela de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Médicas.

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”



Dr. Orlando Rodas Pernillo, MSc.  
Asesor de Tesis

Guatemala, 23 de junio de 2020

Doctor  
**ORLANDO RODAS PERNILLO**  
Docente Responsable  
Maestrías en Ciencias Médicas con Especialidad en Patología con Énfasis en patología  
clínica y anatómica  
Hospital Roosevelt  
Presente

Respetable Dr. Rodas:

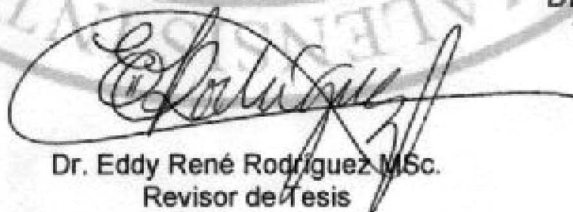
Por este medio, informo que he revisado a fondo el informe final de graduación que presenta la doctora **VIVIAN ALEJANDRA HERRERA GASPARICO**, carné **200410098** de la carrera de Maestría en Ciencias Médicas con Especialidad en Patología con Énfasis en Patología Clínica y Anatómica el cual se titula "**CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES, Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA CLÍNICA DE INFECCIÓN POR MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS**".

Luego de la revisión, hago constar que la Dra. **HERRERA GASPARICO**, ha incluido las sugerencias dadas para el enriquecimiento del trabajo. Por lo anterior, emito el dictamen **positivo** sobre dicho trabajo y confirmo que está listo para pasar a revisión de la Unidad de Tesis de la Escuela de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Médicas.

Atentamente

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

**Dr. Eddy Rodríguez**  
MSC Cirugía General  
Colegiado 7038

  
Dr. Eddy René Rodríguez MSc.  
Revisor de Tesis



Doctor  
**Orlando Rodas Pernillo, MSc.**  
Docente Responsable  
Maestría en Patología con Énfasis en Patología Anatómica y Clínica  
Hospital Roosevelt

Doctor Rodas Pernillo:

Para su conocimiento y efecto correspondiente le informo que se revisó el informe final de la médica residente:

## VIVIAN ALEJANDRA HERRERA GASPARICO

De la Maestría en Patología con Énfasis en Patología Anatómica y Clínica, registro académico 200410098. Por lo cual se determina Autorizar solicitud de examen privado, con el tema de investigación:

**“CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS  
MOLECULARES Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON  
SOSPECHA CLÍNICA DE INFECCIÓN POR MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS”**

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Dr. Luis Alfredo Ruiz Cruz, MSc.  
Responsable  
Unidad de Tesis  
Escuela de Estudios de Postgrado

c.c. Archivo  
LARC/karin -

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>PÁGINAS</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>II. Antecedentes</b>	<b>3</b>
2.1. Datos históricos	3
2.2. Etiología y patogenia	3
2.3. Tuberculosis en niños	3
2.4. Pruebas de diagnóstico	4
<b>III. Objetivos</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
<b>IV. Material y métodos</b>	<b>16</b>
4.1. Tipo de estudio	16
4.2. Población	16
4.3. Selección y tamaño de la muestra	16
4.4. Unidad de análisis	16
4.5. Criterios de inclusión y exclusión	16
4.6. Variables estudiadas	16
4.7. Operacionalización de las variables	17
4.8. Instrumentos utilizados para la recolección de datos	18
4.9. Procedimientos para la recolección de datos	19
4.10. Aspectos éticos de la investigación	20
4.11. Procedimientos de análisis de la información	21
<b>V. Resultados</b>	<b>24</b>
<b>VI. Discusión y análisis de resultados</b>	<b>26</b>
6.1. Conclusiones	28
6.2. Recomendaciones	29
<b>VII. Referencias bibliográficas</b>	<b>30</b>

## RESUMEN

**Introducción:** La tuberculosis (TB) es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la segunda causa de mortalidad de enfermedades transmisibles. Representa casi medio millón de nuevos casos anuales y 8 millones de muertes. **Antecedentes:** El diagnóstico incluye, métodos basados en cultivos ("Gold Standard" Löwenstein Jensen); microscopía con coloración de Ziehl Neelsen (ZN); pruebas moleculares (Xpert MTB/RIF). **Objetivos:** Correlacionar los hallazgos moleculares, citológicos y de cultivo en muestras líquidas y sólidas de pacientes pediátricos que asisten al Hospital Roosevelt en el Departamento de Pediatría del Hospital Roosevelt y Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación con impresión clínica de infección por Mycobacterium Tuberculosis. **Metodología:** Estudio descriptivo, clínico observacional prospectivo. Muestra población pediátrica. **Resultados:** Para PCR (GenXpert©) se encontraron 47 casos verdaderamente positivos de los cuales 24 eran positivos con esta prueba dando una sensibilidad del 51.06% (36.06% - 65.92% IC de 95%), mientras que se encontraron 679 casos verdaderamente negativos de los cuales 642 eran negativos con esta prueba dando una especificidad del 94.55% (92.57% - 96.13% IC de 95%). Para la prueba de Ziehl Neelsen se encontraron 47 casos verdaderamente positivos de los cuales 13 eran positivos con esta prueba dando una sensibilidad del 27.66%(15.62% - 42.64% IC de 95%). **Conclusiones:** Se determinó que la prueba de PCR (GenXpert©) presenta una especificidad de 94.55% y un valor predictivo negativo de 94.54%, sin embargo, cuenta con una sensibilidad moderada de 51.06% y un valor predictivo positivo bajo de 37.34%.

**Palabras clave:** Mycobacterium Tuberculosis, cultivo Lowenstein Jensen, coloración Ziehl Neelsen, GenXpert.

## I. INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la segunda causa más alta de mortalidad entre las enfermedades transmisibles.(1) De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2013, los niños representan casi medio millón de nuevos casos anuales y cerca de 8 millones de niños mueren cada año de tuberculosis.(2) Debido a que la infección en niños es adquirida de los adultos viviendo en los mismos ambientes, la epidemiología es similar a la de adultos. Y debido a la dificultad de diagnóstico y de la confirmación del mismo los datos de tuberculosis en niños a nivel mundial, son poco claros. Otra razón importante para la poca claridad de datos es que los niños no contribuyen de manera significativa a la propagación de la tuberculosis. Algunos datos disponibles sugieren que los niños pueden constituir cerca del 40% de los casos en comunidades con alta incidencia. (3) Es por eso que la tuberculosis en la población pediátrica se considera un evento centinela, que solo indica que existe transmisión reciente en una región desde una persona adulta bacilífera. La tuberculosis no es considerada el primer diagnóstico diferencial de una enfermedad respiratoria en pediátricos, especialmente si se es una región no endémica.(4)

Además, la tuberculosis puede simular otras enfermedades respiratorias como neumonía, infecciones virales o bacterianas, malnutrición o sospecha de inmunodeficiencia adquirida. Y por esta misma razón los pediátricos tienen mayor probabilidad de progresar de infección a enfermedad por lo que todos deberían considerarse como expuestos, infectados o enfermos. La sintomatología clínica en los pacientes pediátricos es inespecífica y en nuestro país hay menor rentabilidad de pruebas microbiológicas por lo que la radiografía de tórax y la prueba de tuberculina continúan siendo la principal herramienta para diagnóstico.(5)

En la actualidad hay avances en métodos de diagnóstico bacteriológico y moleculares para la detección de *Mycobacterium Tuberculosis*, los niños producen pequeñas cantidades de esputo ya que usualmente se lo tragan en vez de expectorarlo, por lo que se recomienda recolectar lavados gástricos matutinos, es por esto que se calcula que solo entre el 10 y 15% de las muestras de esputo revelan bacilos y los cultivos van a permanecer negativos en alrededor del 70% de los casos.(5)

Por lo tanto en este estudio se correlacionaron los hallazgos moleculares, citológicos y de cultivo en muestras líquidas y sólidas de pacientes pediátricos por métodos diagnósticos que incluyen métodos basados en cultivos ("Gold Standard" Löwenstein Jensen), microscopía mediante la coloración de Ziehl Neelsen (ZN) y pruebas moleculares rápidas como Xpert MTB/RIF de la

población pediátrica que asiste al Hospital Roosevelt en el Departamento de Pediatría y Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación con sospecha clínica de infección por Mycobacterium Tuberculosis.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 DATOS HISTORICOS

La Tuberculosis es una antigua enfermedad, estudios en esqueletos humanos muestra que ha afección en humanos por miles de años. La causa de esta afección permanecía desconocida, hasta el 24 de marzo de 1882, el Dr. Robert Koch anunció el descubrimiento del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, evento por el cual se conmemora cada año el día mundial de la Tuberculosis. A finales de 1800, los sistemas de registros “causa de muerte” mostraba que la tuberculosis era una de las causas de muerte principales en países Europeos. Con el desarrollo social y económico el número de casos y muertes por Tuberculosis empezó a declinar en Europa del este y Norteamérica (más lento de 1 a 2% por año). En 1940, el descubrimiento, desarrollo y uso de tratamientos con drogas efectivas aceleró sustancialmente estas tendencias, con índices (por 100,000 población) bajando hasta 10% por año y con índices de mortalidad cayendo incluso más rápido.(6)

### 2.2 ETIOLOGIA Y PATOGENIA

Ahora sabemos que la tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *M. tuberculosis*. Típicamente afecta pulmones (tuberculosis pulmonar) pero también puede afectar otros sitios (tuberculosis extra pulmonar). La enfermedad se contagia cuando personas con infección pulmonar expulsan la bacteria hacia el aire. De los 1.7 billones de personas infectadas con *M. Tuberculosis*, una pequeña proporción (5-10%) desarrollaran “enfermedad por tuberculosis” durante lo largo de su vida. Sin embargo, la probabilidad del desarrollo de la enfermedad es alta en personas infectadas por VIH y en personas con factores de riesgo como desnutrición, diabetes, consumo de tabaco y alcohol. En general, alrededor del 90% de los casos ocurren en adultos, con mayor frecuencia en hombre que en mujeres. La relación hombres y mujeres en adulto es de 2:1 aproximadamente.(6)

### 2.3 TUBERCULOSIS EN NIÑOS

La tuberculosis es la principal enfermedad que causa muerte en todo el mundo, con más de 1.5 millones de muertes por año, es producida por el bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) *M. tuberculosis* y se transmite principalmente por la vía aérea. La tuberculosis es una enfermedad fácilmente reconocible en adultos debido a que produce síntomas clásicos o típicos asociados a características radiológicas y frotis de esputo con resultados positivos, sin embargo, en los pacientes pediátricos es muy difícil diagnosticar por varias razones, entre ellas se pueden mencionar que las características radiológicas son atípicas; obtener una muestra de esputo es

un reto debido que no poseen la habilidad de expectorar y dar una muestra de calidad; en pacientes pediátricos generalmente la infección es extra pulmonar, de forma diseminada y severa, especialmente en niños menores de 3 años, quienes presentan mayor riesgo de mortalidad; es capaz de simular enfermedades comunes como neumonía bacteriana, infecciones virales, desnutrición o infección por VIH; los síntomas son inespecíficos, el 50% de los niños pueden ser asintomáticos en las primeras fases de la enfermedad; es complicado si no se dispone de una prueba de oro (Gold standard) para el diagnóstico; la carga bacilar es menor por lo que puede dar un resultado falso negativo en el frote. Es por esto que la tuberculosis es una razón de morbilidad significativa en niños alrededor de mundo, con mayoría de casos de infección tuberculosa latente y enfermedad activa en países en vías de desarrollo, por ejemplo, en África Subsahariana del total de casos de tuberculosis, el 15 al 20 % son niños.(7)

## **2.4 PRUEBAS DE DIAGNOSTICO**

Las pruebas para diagnóstico incluyen:

- Métodos basados en cultivos: estos constituyen actualmente la prueba de oro (“Gold Standard”); requieren de un laboratorio con personal capacitado, y pueden tardar hasta 12 semanas para mostrar resultados.(6)
- Microscopía mediante la coloración de Ziehl Neelsen (ZN): método desarrollado hace más de 100 años, esta técnica requiere la examinación microscópica de muestras de esputo para determinar la presencia del bacilo.(6)
- Pruebas moleculares rápidas: la única prueba rápida actualmente recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico de tuberculosis es el ensayo Xpert MTB/RIF. Puede mostrar resultados en 2 horas y fue inicialmente recomendado (en el año 2010) para el diagnóstico de Tuberculosis pulmonar en adultos. Desde el 2013 también ha sido recomendado su uso en niños y para el diagnóstico de formas específicas de tuberculosis extrapulmonar. Esta prueba supone mayor sensibilidad que la microscopía de esputo. (6)

### **2.4.1 CULTIVOS DE MYCOBACTERIAS**

Los medios de cultivo han sido desarrollados para el aislamiento de *M. Tuberculosis* en muestras clínicas tales como esputo, fluidos corporales y tejidos. Estos frecuentemente están contaminados con flora corporal normal y requieren la exposición a ácidos y bases para aislamiento del bacilo. Sin embargo, la descontaminación con Hidróxido de Sodio (4%) (método

de descontaminación del esputo más usado), ha mostrado un número reducido de bacilos viables, cerca del 60%. El primer aislamiento exitoso de *M. Tuberculosis* fue realizado por Robert Koch en 1882 usando suero coagulado de bovino; sin embargo, el medio era tan pobre nutricionalmente, que las colonias bacterianas eran mínimas. Desde ese tiempo, se han descrito diferentes medios cultivo, los cuales usualmente son basados en huevo, y agar o usados en forma líquida. Los componentes básicos de la mayoría de medios de cultivo para *M. Tuberculosis* se originaron del trabajo de Proskauer y Beck en 1894.(8)

El uso de estos medios basados en huevo fue introducido en 1903 por Dorset, y representan los medios más usados para el aislamiento de *M. Tuberculosis* en muestras clínicas. Están compuestos por huevo, sales orgánicas e inorgánicas, Asparagina y glicerol como fuente de carbono. Para observar las colonias de *M. Tuberculosis* sobre el medio de huevo, es una práctica usual agregar un colorante al medio antes de la coagulación. A pesar que diferentes colorantes han sido recomendados, el más usado es el “Verde Malachite”, que tiene la ventaja adicional de ser inhibitorio de un pequeño número de organismos contaminantes. Los medios de cultivo basados en huevo más usados son: Löwenstein-Jensen, American Trudeau y Ogawa.(8)

Esta es la técnica de mayor sensibilidad en la detección de *M. tuberculosis* por requerir la presencia de sólo 10 bacilos/ml en la muestra para obtener un resultado positivo.(8)

- Cultivo tradicional: los medios de Löwenstein-Jensen y Middlebrook son los más utilizados y seguros, aunque se requieren entre 4 y 8 semanas para aislar el bacilo y otras 3 a 4 semanas para realizar las pruebas de sensibilidad.(9)

- Técnicas de lectura precoz: el método radiométrico (BACTEC 460 TB) permite disminuir a 10-15 días las primeras lecturas positivas, disminuye el tiempo de estudio de sensibilidad a drogas y permite diferenciar rápidamente entre *M. Tuberculosis* y otras micobacterias. Sus desventajas son el mayor costo, equipos de bioseguridad complejos, mayor contaminación y riesgo para el personal.(9)

#### **2.4.1.1. MEDIOS DE CULTIVO**

Históricamente las muestras estudiadas para la detección de micobacteria han sido cultivadas en medios de agar, y por lo menos en la última década, se han incrementado la sensibilidad de los medios de cultivo para el aislamiento de micobacteria. Múltiples referencias microbiológicas recomiendan el éxito de los medios de cultivo sólido y líquido. Sin embargo, los medios sólidos como Löwenstein-Jensen y el Middlebrook 7H10 requieren incubación de por lo menos 6

semanas. A pesar de la alta sensibilidad de Löwenstein-Jensen, no es confiable para otras especies de micobacterias, al igual que el medio Middlebrook 7H10; por lo que estos medios están dejando de usarse como pruebas rutinarias en muchos laboratorios. Se han desarrollado muchos medios y caldos de cultivo y sistemas para el aislamiento de especies de micobacterias, estos incluyen el BACTEC 460TB, el AFB (Acid-Fast Bacillus biphasic Septi-Chek, el BACTEC MB9000.(10)

#### **2.4.1.2. SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE CULTIVO**

El sistema BACTEC 460TB fue la primera mejora en la detección micobacterias en años, ya que incrementaba la detección y reducía el tiempo de detección. El sistema BACTEC 460TB con los medios solidos se convirtieron en el "Gold standard" para cultivar micobacterias. El MB9000 instrumento automatizado, es un sistema continuo basado en fluorescencia, usa el medio Middlebrook 7H9 en conjunto con un suplemento de antibióticos que suprimen el crecimiento de microorganismos contaminantes. El sistema MB9000 ha sido favorablemente comparable con el sistema BACTEC 460TB y el AFB, sin embargo el uso de medios solidos unidos a este sistema es todavía remendado.(10)

TB BACTEC es un sistema automatizado creado como método de antibiograma, es el único aceptado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA por sus siglas en inglés) inicialmente era un sistema radiométrico (que se basa en estudiar la medida de la radiación electromagnética).(11)

Este método fue desarrollado por Johnston Laboratories, Inc., (Towson, Maryland) para la rápida detección de micobacterias utilizando el medio Middlebrook 7H12 que contiene sustrato de ácido palmítico marcado con C<sup>14</sup>, en la actualidad se han desarrollado nuevos sistemas BACTEC automatizados que permiten obtener resultados de pruebas de sensibilidad a drogas antituberculosas en un menor tiempo, que el método de las proporciones y a gran escala (que permite 960 cultivos), sin embargo tiene un costo mucho más alto, pero tiene la ventaja de que dejó de ser radioactivo por lo que es más seguro para el personal del laboratorio de microbiología.(12)

#### **2.4.1.3. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE METODOS DE CULTIVO AUTOMATIZADO**

En 1989 se realizó un ensayo que tuvo duración de 4 meses con 2,563 muestras clínicas de rutina para comparar el BACTEC con los medios convencionales como Löwenstein-Jensen para el aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad de micobacterias. Con BACTEC se

recuperaron 162 aislamientos de micobacterias, 147 (91%) y con medios Löwenstein-Jensen 118 (73%). De estos, 62 eran cepas complejas de *Mycobacterium tuberculosis*, 59 (95%) fueron aisladas con BACTEC y 54 (87%) fueron aisladas con medios Löwenstein-Jensen. De los 100 aislamientos restantes, que eran micobacterias distintas de la tuberculosis (por sus siglas en inglés MOTT), BACTEC y Löwenstein-Jensen, los medios detectaron 88 y 64%, respectivamente. La tasa de contaminación fue significativamente mayor en BACTEC (5%) que en el medio Löwenstein-Jensen (3.3%). El tiempo medio de aislamiento para el complejo *M. Tuberculosis* con BACTEC fue de 15.5 días, en comparación con 25,6 días con Löwenstein-Jensen. Para MOTT, los tiempos de aislamiento promedio fueron 5.8 y 21.4 días, respectivamente. Los resultados de las pruebas de sensibilidad de 18 complejos de *M. Tuberculosis* aislados con BACTEC coincidieron completamente con los obtenidos por el método de relación de resistencia de antibióticos. (13)

En el 2000, se publicó un estudio que determinaba si la adición de medio de Löwenstein-Jensen al sistema MB9000 era necesario para el cultivo de especímenes clínicos para micobacterias. Los resultados mostraron que del total 2271 especímenes, que fueron cultivados tanto en MB9000 como en Löwenstein-Jensen, incluyeron muestras respiratorias, de sangre, fluidos corporales, tejidos y heces, 317 (14%) fueron positivos para 331 aislamientos de micobacterias en 1 o ambos medios. El sistema MB9000 fue positivo para 238 (71.9%) de 331 aislamiento, mientras que Löwenstein-Jensen fue positivo para 239 (72.2%) de 331 aislamientos. Las mismas 146 especies de micobacterias fueron detectadas en ambos sistemas, mientras que 92 aislamientos fueron recuperados por el sistema MB9000 y 93 aislamientos por el cultivo Löwenstein-Jensen. En conclusión, los índices de recuperación para micobacterias del sistema MB9000 y Löwenstein-Jensen fue similar (239 versus 238) y el número de aislamientos detectados en cada medio por separado también fue similar (92 versus 93). Sin embargo, el MB9000 recuperó el 100% de los aislamientos de *M. Tuberculosis* (38/38), mientras que el cultivo Löwenstein-Jensen recuperó solo 23 de los 38 aislamientos. En este estudio concluyeron que, debido a los métodos para cultivo de micobacterias tan avanzados que existen en comparación cuando solo se utilizaban medios sólidos, es tiempo de reevaluar los nuevos sistemas por su habilidad para ser métodos de cultivo aceptables. Este estudio demostró que al menos 1 de los nuevos métodos automatizados, el MB9000, puede ser confiable para el cultivo de estos microorganismos. Declarando que el uso rutinario del cultivo Löwenstein-Jensen con el sistema automatizado MB9000 para el cultivo y la detección de micobacterias no es clínicamente garantizado, ni es beneficio costo efectivo, y podría administrarse tratamientos inapropiados para los pacientes.(10)

#### **2.4.1.4. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE CULTIVO Y PCR**

En el 2010, se publicó un estudio en niños con síntomas sugestivos de infección por tuberculosis pulmonar registrados de agosto del año 2002 a enero del 2007, en dos hospitales en Lima, Perú. Los casos fueron agrupados en categorías de bajo-riesgo y alto-riesgo según puntaje de Stegen-Toledo, dos especímenes de cada tipo fueron tomados de cada caso (aspirado gástrico, aspirado nasofaríngeo y muestra de heces), para búsqueda de *M. Tuberculosis* por cuatro métodos: microscopia por auramina, por técnica caldo de cultivos de observación microscópica de susceptibilidad a drogas (MODS) (Medio Middlebrook 7H9 modificado), el cultivo estándar medio Löwenstein-Jensen, y PCR (Heminested IS6110). Los especímenes control consistieron en un aspirado nasofaríngeo y dos muestras de heces, examinados con las mismas técnicas. Este estudio presentó una directa comparación de métodos de cultivo y PCR, con diferentes tipos de especímenes y utilizando los dos métodos, para el diagnóstico de tuberculosis pediátrica en áreas con escasos recursos. En estos casos de población pediátrica peruana, la técnica MODS (Middlebrook 7H9) dobló la sensibilidad diagnóstica de los cultivos y fue tiempo requerido fue menos comparado con el cultivo tradicional Löwenstein-Jensen, 70% más casos fueron diagnosticados teniendo cultivo Middlebrook positivo para tuberculosis comparado con Löwenstein-Jensen, y todos los especímenes de estos adicionales fueron auramina negativos por microscopia. La velocidad y la sensibilidad de la técnica MODS (Middlebrook 7H9) resulta del uso de caldo de cultivos con detección microscópica de cultivos positivos antes de que sean lo suficientemente grandes para ser detectados a simple vista y la capacidad de esta técnica para cultivar un gran volumen de cada espécimen clínico. Este amplio campo diagnóstico en niños con cultivos positivos para tuberculosis por adición del método MODS excede el 10-20% adicional visto en pacientes adultos peruanos de alto-riesgo, como se podría esperar en muestras diagnósticas de niños que usualmente contienen pocas micobacterias. Estos resultados apoyan las recomendaciones de la OMS, que sugieren que las técnicas de cultivo líquidas son superiores a las técnicas basadas en Agar. En general la técnica MODS fue mejor que el cultivo Löwenstein-Jensen en frotis con auramina con microscopia negativa, que incluían la mayoría de especímenes con cultivos positivos. La prueba de PCR no fue lo suficientemente sensible ni específica, como diagnóstico de rutina, pero en niños de alto-riesgo obtuvo la misma identificación que la mitad de todos los cultivos positivos.(14)

#### **2.4.2 MICROSCOPIA DE EXTENDIDO DE ESPUTO (BACILOSCOPIA)**

Con recursos limitados los frotis preparados directamente de muestras de esputo para microscopía óptica convencional con tinción de ZN son los más ampliamente utilizados para

diagnosticar *M. Tuberculosis* ya que es altamente específica, pero la sensibilidad es variable (20% –80%).(15)

En términos generales, se realiza un extendido del material y mediante la coloración de ZN, se puede evidenciar la presencia de BAAR en las muestras de cualquier líquido o tejido, solo requiere 15 minutos para su lectura. Además de su valor diagnóstico, este procedimiento tiene importancia epidemiológica, ya que detecta a los pacientes bacilíferos positivos, que son la fuente de transmisión de la enfermedad. Tiene menor sensibilidad que el cultivo, ya que para obtener un resultado positivo requiere que la muestra presente, como mínimo, 5.000-10.000 bacilos/ml, lo cual la hace aún menos sensible en pediatría, en donde la enfermedad es habitualmente paucibacilar (con bajo nivel de bacilos en la expectoración). Su especificidad es baja, ya que no diferencia tipos de micobacterias.(9)

El espécimen más comúnmente examinado es el esputo mediante el examen microscópico de ZN o una muestra teñida con auramina que permite la detección de la mayoría de las cepas en menos de una hora. ZN es el procedimiento más utilizado para la identificación de *M. Tuberculosis* en frotis. Los insumos necesarios para el procedimiento de tinción son: fucsina básica, fenol, alcohol absoluto, ácido sulfúrico y azul de metileno, posteriormente se debe evaluar el frote bajo un objetivo de inmersión en aceite (100X), y esto revela bacilos de color rojo. También existe otro método de tinción, el fluorescente con auramina, para este se hace un frote con la muestra del espécimen y se colorea con una tinción fluorescente llamada auramina. La tinción de auramina ingresa a la pared celular bacteriana del *M. Tuberculosis* y las hace brillar contra un fondo oscuro utilizando luz ultravioleta. Esta búsqueda se realiza en un microscópico con un objetivo de menor aumento y como se mencionó anteriormente hace que los bacilos con aspecto de arroz brillen de color blanco amarillo.(16)

En los países en desarrollo, la microscopía sigue siendo el método más rápido, barato y confiable para la detección de bacilos de *M. Tuberculosis*, sin embargo, han incluido la tinción fluorescente en el programa nacional de tuberculosis ya que se ha demostrado que obtiene resultados más sensibles y rápidos y puede ser puesto en práctica incluso en áreas rurales. India tiene gran record de proyectos de investigación acerca de Tuberculosis, es por eso que en la ciudad de Meerut, en el año 2011 se realizó un estudio que tuvo duración de 6 meses, en un centro de tratamiento de observación directa de corta duración, con el fin de comparar la eficacia de la tinción de fluorocromo (FI) con la tinción convencional de ZN para obtener el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. Se tomaron en cuenta para este estudio 388 casos con sospecha de tuberculosis pulmonar. Se detectaron 57 (14,69%) muestras positivas en comparación con 29 (7,47%) muestras positivas que se detectaron con tinción ZN.(17)

En pacientes pediátricos con sospecha clínica y radiológica de tuberculosis pulmonar cuando se toma como muestra el esputo, la tinción de ZN no es lo suficientemente sensible y un gran número de casos sospechosos no se detectan y por ende no se les da tratamiento. Por lo que concluyeron que cuando la muestra se trata de esputo, es la tinción fluorescente la más eficiente para detectar bacilos tuberculosos que la tinción de ZN, porque al evaluar la tinción con fluorescencia lo hacen en campos de alto poder (40X) mientras que el método de ZN se hace a un aumento con aceite de inmersión (100X), además recomendaron que se utilice el método de fluorescencia si se van a examinar una gran cantidad de frotos de esputo; los bacilos cuando son fluorescentes se identifican fácilmente, haciendo menos desgastante a la vista la búsqueda de los mismos.(17)

#### **2.4.2.1 ESTUDIOS COMPARATIVOS DE CULTIVOS LOWENSTEIN Y MICROSCOPIA POR ZN**

En Libia, se realizó un estudio transversal analítico comparativo retrospectivo, desde enero 2016 hasta diciembre de 2016, en pacientes sospechosos de tuberculosis pulmonar, se procesaron un total de 2783 frotos para microscopía con tinción de ZN y para cultivo en medio Löwenstein-Jensen, de los cuales 203 (7,29%) fueron frotos positivos, mientras que 327 (11,74%) fueron positivos en cultivo; de los 203 casos pulmonares con baciloscopia positiva, se encontró que 154 (47.094%) fueron positivos en cultivo Löwenstein-Jensen; un total de 2407 de los casos pulmonares fueron negativos para M. Tuberculosis en el frote y en el cultivo de Löwenstein-Jensen, por lo que se concluyó que la microscopía directa en frotos con tinción de Zn tiene baja sensibilidad diagnóstica de tuberculosis, mientras que el cultivo en Löwenstein-Jensen sigue siendo considerado el método diagnóstico Gold standard.(18)

#### **2.4.2.2 RECOLECCION Y OBTENCION DE MUESTRA PARA BACILOSCOPIA**

Se enfatiza que recolectar una muestra de esputo en niños es un reto, ya que necesita de una respiración profunda. La mayoría de los niños menores de 7 años no tienen la suficiente fuerza, ni la coordinación oromotora para producir un espécimen producto de expectoración, de buena calidad. Hay otras técnicas semi invasivas, como la aspiración gástrica y el lavado gástrico, o también puede ser necesario la inducción de esputo con o sin aspiración nasofaríngea, este último puede proporcionar resultados de microbiología similares si lo comparamos con la aspiración gástrica.(16)

Es por esto que el diagnóstico de tuberculosis en niños, es complicado ya que como se mencionaba la obtención de la muestra es un desafío, por lo mismo las muestras generalmente

son reportadas como material insuficiente, y a su vez es material paucibacilar, por la poca cantidad de bacilos en dichos especímenes. Es por esta razón que realizaron un estudio que tuvo como objetivo evaluar los métodos para diagnosticar la tuberculosis en niños en Sudán, comparando resultados de prueba cutánea de tuberculina, cultivo convencional, métodos de microscopía y amplificación por PCR, utilizando como muestra 197 niños menores de 15 años, con síntomas sospechosos de tuberculosis, que asistieron a 5 centros hospitalarios; recolectaron datos por medio de un cuestionario y realizaron pruebas de tuberculina cutánea, se tomaron muestras de lavado gástrico en menores de 7 años y de esputo en niños mayores de 7 años. De las 197 muestras recolectadas, 89 (45.2%) fueron muestras de aspirado gástrico, mientras que 108 (54.8%) fueron muestras de esputo. Después de la descontaminación, y separar cada muestra recolectada, se evaluaron mediante cultivo, microscopía (ZN y tinciones de fluorescencia auramina) y PCR., obteniendo como resultado que en medio de cultivo Löwenstein-Jensen, el estándar de referencia, reveló crecimiento en el 16,2% de los especímenes. El análisis comparativo mostró que 43.7% fueron positivos para la prueba cutánea de tuberculina (con sensibilidad 100% y especificidad 67.3%), 8.1% fueron positivos con tinción de ZN (sensibilidad 43.8% y especificidad 98.8%), 11.2% con tinción de auramina (sensibilidad 56.3% y especificidad 98.8%) y 17.8% fueron positivos con amplificación por PCR utilizando la secuencia IS6110 (sensibilidad 100% y especificidad 98.8%). Concluyeron que la prueba de tuberculina cutánea y la PCR lograron una sensibilidad del 100%, pero la PCR es más específica, por lo que la prueba de tuberculina cutánea se recomienda para el diagnóstico de rutina y el uso de PCR para casos particulares, dependiendo de las instalaciones del centro hospitalario y la urgencia de cada caso. (19)

Hay otro método alternativo de obtención para las muestras respiratorias que consisten en el uso de una cápsula de gelatina que contiene una cuerda de nylon (cuerda dulce), se traga y luego se recupera para cultivo de *M. Tuberculosis*. El procedimiento es tolerable para los niños que pueden tragar y el resultado del cultivo tiene similitud a la obtención de esputo en estudios preliminares.(20)

Como se mencionó anteriormente en la población pediátrica es más frecuente la tuberculosis extrapulmonar, por lo que se recomienda recolectar muestras específicas del sitio sospechoso de infección para el cultivo de *M. Tuberculosis*, tales como líquido cefalorraquídeo, biopsias por aspiración de aguja fina de ganglios linfáticos y otras muestras de tejido. Sin embargo, se ha determinado que los resultados son variables como es el caso del hemocultivo micobacteriano,

que tiene rendimiento limitado en niños comparados con adultos, debido a la baja carga bacilar.(21)

La identificación de los casos infecciosos es el primer paso crucial para los programas de tuberculosis a nivel mundial. Depende en exclusivo de la detección de los bacilos acid/alcohol resistentes en esputo por microscopia, método que continua siendo usado en la mayoría de laboratorios desde su introducción en el siglo XIX. Se estima que menos del 20% de aproximadamente 8 millones de posibles casos anuales, es identificado con microscopía positiva. Objetivos como 70% de detección y 85% de tratamientos satisfactorios no serán alcanzados por microscopia. Por lo tanto es necesario, mejorar la sensibilidad del extendido de microscopia. En el año 2005 se desarrolló un método universal de procesamiento de muestras, por sus siglas en ingles *Universal sampling processig USP* para el diagnóstico de tuberculosis en especímenes pulmonares y extrapulmonares. Posteriormente se realizó un estudio en donde se comparó el método USP con los dos métodos de microscopia usados más comunes, entiéndase, la microscopia directa y el métodos NALC-NaOH (desarrollado por la CDC, *Center for Disease Control*). El método USP consiste en la homogenización y descontaminación de los especímenes con la solución USP (4 a 6 M guanidium hidrocloreto, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 25mM EDTA, 0.5% Sarkosyl, 0.1 a 0.2 Beta-mercaptoetanol). La solución fue agregada a cada muestra de esputo, luego a mezcla a mano por 1 a 2 minutos. Luego incubado por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, para después agregar de 10 a 15ml de agua estéril, posteriormente se centrifugó a 5,000 X g a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos y finalmente el sedimento se utilizó para microscopia, cultivo y isolacion de ADN para PCR. Los resultado mostraron que la sensibilidad de la microscopia con extendidos con el método USP fue de 97 a 98%, en contraste con el 68% de la microscopia directa y el 80% con el método CDC; y la el aumento del 18 a 30% de la sensibilidad fue altamente significativo ( $P < 0.0001$ ). En términos de métodos de cultivo, el método USP no fue significativamente diferente a los métodos convencionales.(22)

### **2.4.3 PRUEBAS MOLECULARES RAPIDAS**

El Sistema GeneXpert MTB / RIF consiste en la extracción y amplificación de ADN, requiere manipulación mínima de la muestra y es operador dependiente. Utiliza tecnología de PCR en tiempo real (rt-PCR) para detección de *M. Tuberculosis* y a la vez detectar resistencia a la rifampicina debido a que esta prueba amplifica una región del gen *rpoB* del *M. Tuberculosis* y son las mutaciones de esta región las que dan el 95% de la resistencia a la rifampicina. Esta prueba tiene ventaja sobre el cultivo con Löwenstein-Jensen principalmente por ser más específico y porque se obtienen resultados en menor tiempo.(7)

En el año 2015 se realizó una revisión sistémica y meta análisis cuyo objetivo era establecer estimaciones resumidas para la sensibilidad y especificidad del método Xpert MTB / RIF en comparación con la microscopía en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en niños, en él, realizaron búsquedas de estudios publicados hasta el 6 de enero de 2015, entre sus criterios de inclusión tomaron en cuenta todos los estudios que usaron Xpert con niños con y sin infección por VIH, luego revisaron sistemáticamente los estudios que compararon la precisión diagnóstica de Xpert MTB / RIF.(23)

Xpert con detección de tuberculosis pulmonar por microscopía y resistencia a la rifampicina en niños menores de 16 años en comparación con dos estándares de referencia: resultados de cultivo y niños con cultivo negativo que comenzaron antifímicos, para luego realizar un meta análisis utilizando un modelo bivariado de efectos aleatorios y se identificaron 15 estudios que incluyeron 4768 muestras respiratorias en 3640 niños investigados por tuberculosis pulmonar. De todos los niños evaluados, los cultivos fueron positivos para tuberculosis en el 12% (420 de 3640) y Xpert fue positivo en 11% (406 de 3640). En comparación con el cultivo, en cuanto a la especificidad y sensibilidad de Xpert por tuberculosis, con muestras expectoradas o muestras de esputo inducidas la detección fue del 62% (con intervalo confiable del 95% 51-73) y 98% (97-99), respectivamente, para el lavado gástrico 66% (51-81) y 98% (96-99), respectivamente. La sensibilidad de Xpert para el esputo expectorado o esputo inducido fue 36-44% mayor que la sensibilidad para microscopía. La sensibilidad de Xpert en niños con cultivo negativo y que ya iniciaron tratamiento antifímico, fue del 2% (1-3). La sensibilidad y la especificidad de Xpert para detectar la resistencia a la rifampicina fue del 86% (intervalo confiable del 95% 53-98) y 98% (94-100), respectivamente.(23)

Concluyen que, en comparación con la microscopía, Xpert ofrece una mejor sensibilidad para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Sin embargo a pesar de que Xpert ayuda a proporcionar una rápida confirmación de la enfermedad, su sensibilidad sigue siendo subóptima en comparación con las pruebas de cultivo. Un resultado negativo de Xpert no descarta la tuberculosis. Aún se necesita una buena perspicacia clínica para decidir cuándo comenzar los antifímicos.(23)

#### **2.4.3.1 GENE XPERT Y TÉCNICAS CONVENCIONALES**

En el Hospital General de Lahore, Pakistán, se realizó un estudio descriptivo longitudinal durante enero de 2017 a diciembre de 2018, con muestras de esputo tomadas a pacientes sospechosos de tuberculosis extrapulmonar con el fin de evaluar el rendimiento de Gene Xpert para la detección de M. Tuberculosis y comparar sus resultados con técnicas convencionales en

términos de validez, rapidez y resistencia a la rifampicina. Con las muestras de esputo se realizaron frotos para ser evaluados por microscopía con tinción de ZN y se cultivaron en medios de cultivo Löwenstein-Jensen según el protocolo de la OMS y el protocolo del fabricante de Gene Xpert. SPSS 17 se utilizó para el análisis de datos. La validez de Gene Xpert y la resistencia a la rifampicina se determinaron y compararon con la tinción de ZN utilizando el cultivo de Löwenstein-Jensen como Gold standard. De las 212 muestras de esputo, 84 (39.6%) fueron positivas en cultivo de Löwenstein-Jensen con un tiempo de respuesta promedio de  $20 \pm 6$  días, 77 (36.3%) con Gene Xpert y 22 (10.4%) en frotos teñidos con ZN. La tasa de detección más alta de M. Tuberculosis 62 (80.5%) fue en biopsias de ganglios linfáticos con Gene Xpert. La sensibilidad y especificidad de GeneXpert fueron 91.6% y 100% respectivamente, mientras que para ZN mostró una sensibilidad de 26.2% y una especificidad de 100%. Gene Xpert detectó resistencia a la rifampicina en 5 (6,4%) muestras de esputo. Por lo que concluyeron que Gene Xpert tuvo una mayor validez en comparación con la microscopía de frotos de ZN.(24)

#### **2.4.3.2 GENE XPRT EN DIFERENTES MODALIDADES DIAGNOSTICAS**

Se realizó un estudio transversal con duración de 24 meses en la ciudad de Dhule, India, con 150 pacientes pediátricos del centro de atención terciaria, los cuales se dividieron en dos grupos, un grupo sospechoso de tuberculosis y otro con síntoma de tos de más de dos semanas de evolución, aplicando a los resultados las pruebas estadísticas de chi cuadrado y correlación de Pearson obteniendo como resultado que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) de positividad GeneXpert dentro de diferentes rangos de edades, y que del grupo de pacientes con sospecha de tuberculosis, GeneXpert fue positivo en 80% de los casos. Y concluyeron que GeneXpert es un método novedoso para diagnóstico en todos los casos de sospecha de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. La tasa de detección de casos aumenta si a GeneXpert se le agrega otro método diagnóstico primario y lo consideran como método principal en casos de frotos negativos especialmente porque es más sensible en pacientes pediátricos.(25)

Un informe en la literatura reciente indicó que la infección latente por tuberculosis puede diagnosticarse mejor empleando interferón gamma que con la prueba cutánea de tuberculina.(26) La detección del micobacterias en heces puede ser una opción si se tienen las pruebas GeneXpert MTB / RIF disponibles.(27)

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

3.1.1 Correlacionar los hallazgos moleculares, citológicos y de cultivo en muestras líquidas y sólidas de pacientes pediátricos que asisten al Hospital Roosevelt en el Departamento de Pediatría del Hospital Roosevelt y Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación con impresión clínica de infección por Mycobacterium Tuberculosis

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Correlacionar los hallazgos de PCR (GenXpert©) con el Gold Standard (Löwenstein Jensen)

3.2.2 Correlacionar los hallazgos de Ziehl Neelsen con el Gold Standard (Löwenstein Jensen)

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. TIPO DE ESTUDIO**

Estudio descriptivo longitudinal

### **4.2 POBLACIÓN**

Todas las muestras líquidas y sólidas provenientes de pacientes pediátrico hasta los 12 años de edad, de sexo femenino y masculino que asista a la consulta de la pediatría del Hospital Roosevelt y Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación que tenga impresión clínica de infección por Mycobacterium Tuberculosis durante periodo de 2014-2016.

### **4.3 SELECCIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA**

El marco muestral de esta investigación está constituido por la población pediátrica que asiste al Hospital Roosevelt en el Departamento de Pediatría y Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, se tomaron en cuenta todos los pacientes con manifestaciones clínicas de infección por Mycobacterium Tuberculosis, dicha información proporcionada por médicos residentes y/o personal de microbiología del hospital Roosevelt.

### **4.4 UNIDAD DE ANÁLISIS**

Pacientes pediátricos que asisten al Hospital Roosevelt en el Departamento de Pediatría del Hospital Roosevelt y Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación con impresión clínica de infección por Mycobacterium Tuberculosis.

### **4.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

#### **4.5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

4.5.1.1. Se tomaron en cuenta para el estudio, la población de pacientes pediátricos que asisten al Hospital Roosevelt en el Departamento de Pediatría y Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, durante el año 2015 y parte del año 2016.

#### **4.5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

4.5.2.1. No hay criterios de exclusión, se tomó el total del universo a estudio.

### **4.6 VARIABLES ESTUDIADAS**

- Reacción de cadena de la Polimerasa (PCR)
- GeneXpert

- Tinción de Ziehl – Nielsen
- Medio de cultivo Löwenstein Jensen

#### 4.7 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable compleja	Definición conceptual	Variabes	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Instrumento
Método Biología molecular	Método de amplificación, técnica in vitro que imita la habilidad natural de duplicar ADN. Se toma una muestra mínima de material genético, se copia la secuencia de interés las veces necesarias y se genera suficiente cantidad de muestra para detectar la presencia o ausencia de patógenos y se cuantifica	PCR (Reacción de cadena de la Polimerasa)	Amplificar con cebadores apropiados detectar después un fragmento de una determinada especie por electroforesis y tinción de bromuro de etidio	Cualitativa	Nominal	Positivo Negativo
		GeneXpert	Prueba molecular automatizada, detecta Mycobacterium Tuberculosis	Cualitativa	Nominal	Positivo Negativo
Método citológico	En la técnica de Ziehl- Nielsen se utiliza un agente tenso activo (alta concentración de fenol en el carbol fuscina) que aumenta la permeabilidad del colorante a través de la capa cérica. Esta alta concentración de fenol permite disolver el material lipídico de la pared celular de la micobacteria, lo cual ocasiona la penetración de la carbol fuscina sin la necesidad de calor	Tinción de Ziehl- Neelsen	Examinar con un objetivo de aceite de inmersión x 100. Las micobacterias se colorean rojo y el fondo de azul pálido	Cualitativa	Nominal	Positivo Negativo
Método de Cultivo	Löwenstein Jensen técnica dirigida en las que se sospecha de una escasa población bacilar y tiene mayor sensibilidad y especificidad	Medio de cultivo Löwenstein Jensen	Se conserva a temperatura de 37°C por 48 horas 20 días	Cualitativa	Nominal	Positivo Negativo

## **4.8 INSTRUMENTO UTILIZADO PARA LA RECOLECCION DE INFORMACIÓN**

Los instrumentos a utilizar son:

- Base de datos del laboratorio de microbiología del Hospital Roosevelt
- Boleta de recolección de datos

## **4.9 PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS**

### **4.9.1 TÉCNICA**

Para realizar éste trabajo, se estudiarán la totalidad de muestras clínicas obtenidas de diferentes procedencias (aspirado traqueal, aspirado gástrico, esputo, orina, secreción de abscesos, heces, biopsias, sangre, fluidos corporales, médula ósea, líquido cefalorraquídeo), las cuales serán procesadas en un tiempo no mayor de 24-48 horas una vez recibidas. Las muestras clínicas serán obtenidas de pacientes hospitalizados en el Departamento de Pediatría del Hospital Roosevelt y en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, así como de pacientes ambulatorios que fueran referidos a la sección de neumología o clínica de infecciosas en el mismo período de tiempo.

### **4.9.2 PROCEDIMIENTOS**

#### **4.9.2.1 Estudios bacteriológicos**

De cada muestra recibida se realizaron frotis para las coloraciones de Gram y Ziehl-Neelsen. Las muestras se sometieron al proceso de descontaminación y homogenización, según el método de Petroff y se cultivaron en el medio de Löwenstein Jensen (tres tubos), incubándolos a temperatura ambiente, a 37°C, y a 42 °C. Los cultivos se observaron por un período de siete días, hasta un máximo de sesenta días. En aquellas muestras con crecimiento bacteriano presuntivo de Micobacterias se estudiaron los siguientes parámetros: Aspectos macroscópicos de las colonias (morfología), aspectos microscópicos del cultivo (coloraciones), determinación de las características del cultivo (tiempo y temperatura óptima de crecimiento).

#### **4.9.2.2 Reacción de polimerización en cadena (PCR) y GenExpert**

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son de alta especificidad y exagerada sensibilidad por lo que para evitar falsos positivos generalmente solo se analizan los esputos

BAAR positivos. Se basan en amplificación de material genético bacilar por algún tipo de PCR, la hibridación con sondas que detectan genes específicos del complejo Mycobacterium Tuberculosis y de resistencia a R (rpoB) (GenExpert). Un prototipo es la prueba de HAIN.

En caso de obtención de resultados positivos con GenExpert se procedió a utilizar como blancos moleculares para PCR HAIN varias secuencias nucleotídicas presentes en el género de las Micobacterias para identificación y sensibilidad de microorganismo: la secuencia IS6110 (presentes en el complejo M. tuberculosis), mtp40 (presente en M. tuberculosis) y hsp65 (presente en las Micobacterias, nocardias y actinomices). Los oligonucleótidos empleados, la secuencia a amplificar y el tamaño del producto de PCR, así como el protocolo de amplificación y el análisis de polimorfismo de restricción (PRA) son los descritos previamente. Además, el uso del método de Wong y col. Que se basa en la amplificación por PCR de un fragmento del gen hsp65 seguido del análisis de restricción usando las enzimas de restricción Sau96I.

#### **4.9.2.3 QuantiferonTB Gold**

Es una técnica de tamizaje, detecta anticuerpos circulantes. Tiene baja sensibilidad en pacientes pediátricos. Técnica moderna de detección de infección latente. Consiste en la exposición de linfomonocitos del paciente durante 6 a 24 horas a antígenos de Mycobacterium Tuberculosis (ESAT-8, CFP 10 y TB 7.7) midiendo la respuesta inmunitaria celular a través de la producción de gamma interferón. La muestra puede dar resultado positivo, negativo o indeterminado con independencia de vacunación BCG o infección micobacteriana en general. Esta prueba es de poca utilidad para detectar infección latente en pacientes VIH/SIDA con inmunodepresión avanzada.

Durante el año 2014 y 2015 se le dio seguimiento a las muestras ingresadas al laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt, se recibieron en total 186 muestras de diferentes orígenes de pacientes sospechosos de infección por Mycobacterium Tuberculosis.

De esas 186 muestras solo a 94 se le practicó Gen Expert, de las cuales 14 correspondían a los servicios de pediatría. Obteniendo resultados negativos. Al igual que en los medios de cultivos de Löwenstein Jensen, los cuáles al momento van con resultado preliminar negativo. Durante el mes de marzo del año 2014, 6 casos de 25 dieron resultado positivo para GenXpert sin embargo resultado negativos en medios de cultivo. Durante el mes de abril del año 2014, se registraron 19 casos de los cuales 5 resultaron positivos para Gen Expert. En el mes de mayo se reportaron 3 casos positivos de 24 casos. Y los registros del mes de junio se documentaron hasta el día 15; de 4 casos al momento se reportó 1 caso positivo. (Ver cuadros anexos)

Como dificultades potenciales al realizar la recolección de datos cabe mencionar que en el laboratorio de Microbiología no se trabajan muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo y médula ósea de pacientes menores de 5 años para pruebas serológicas (PCR y Gen Expert) ya que anteriormente se han detectado falsos positivos en gran cantidad; esto fue investigado en conjunto con departamento de Infectología pediátrica.

Además se notificó a todos los residentes de pediatría acerca de la puesta en marcha de la recolección de datos y explicar la finalidad ya que se evidenció que se realizan más pruebas para detección de Mycobacterium Tuberculosis en el área de adultos que en el área de pediatría a pesar de tener actualmente varios casos sospechosos de infección en los diferentes servicios del Hospital. Trabajo de Investigación aprobado por Departamento de Docencia e Investigación del Hospital Roosevelt.

#### **4.10 PROCEDIMIENTO PARA GARANTIZAR LOS ASPECTO ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Esta investigación se clasifica como Categoría II (riesgo mínimo) para la población a estudio porque comprenderá estudios y registro de datos por medio de extracción de sangre y toma de muestras de diferente origen según amerite el caso. Además se fundamentó en los principios éticos de Beneficencia, No maleficencia, Autonomía y Justicia.

Respecto a la recolección de datos:

- Se proporcionó información al médico acerca del motivo de estudio
- Se indicó que la participación en el estudio es de carácter voluntario
- Se indicó que no obtendrá ningún beneficio o perjuicio al participar en el estudio más que el diagnóstico propiamente dicho

Respecto a la relación médico paciente:

- Se demostró respeto hacia los pacientes
- Se solicitó con amabilidad la información o ayuda que sean necesarias
- Se tomó actitud del médico adecuada con identificación como trabajador del Hospital
- Se tuvo en todo momento actitud profesional

Respecto a la Información y confidencialidad:

- No se modificó la información original proporcionada por el médico
- No se divulgó la identidad de los pacientes que participaron en el estudio

- No se comentó públicamente sobre casos o experiencias de sujetos a estudio

Otro aspecto que se consideró en la realización de este estudio desde el punto de vista ético fue que se garantizó que el mismo tuviera un valor potencial considerable, es decir con una alta probabilidad de obtener resultados útiles. Esta investigación no tiene el potencial de generar conflictos de intereses.

Se tomó como modelo para la realización de este estudio los lineamientos propuestos en la declaración de Helsinki tomando como deber fundamental del médico velar por la salud de las personas y la preocupación por el bienestar de los seres.

Para el cumplimiento de esta actividad se mantuvo comunicación con médicos residentes encargados de dicho servicio y con área de microbiología quienes reportaran casos sin necesidad de firmar consentimiento informado, al finalizar el estudio los pacientes que participaron no obtuvieron beneficios ni perjuicios al ser partícipes del mismo más que la administración del tratamiento y seguimiento adecuados.

#### **4.11. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN**

Se procesaron los datos (dispersos, desordenados, individuales) obtenidos de la población objeto de estudio durante el trabajo de campo, y se tuvo como finalidad generar resultados (datos agrupados y ordenados), a partir de los cuales se realizó el análisis según los objetivos planteados.

El procesamiento de datos se realizó mediante el uso de herramientas estadísticas, con el apoyo de programas electrónicos, tabulados previamente en hoja de cálculo de Excel office 2013, los datos fueron exportados a STATA 14 ® y EPI INFO 7 ©.

A continuación se detalla el proceso que se siguió en el plan de procesamiento de datos:

- Se detallaron las variables identificadas que fueron objeto de estudio, según la definición de variables y los instrumentos elaborados.
- Se determinaron las variables que ameritaban ser analizadas individualmente o presentadas en cuadros simples.
- Se realizó listado de los cuadros y gráficos.

Para el cálculo de las tasas brutas de incidencia se utilizaron como población de referencia el último censo de la población (Fuente INE año 2002) y las tasas estandarizadas por edad, población mundial, realizándose el cálculo por medio de ajuste directo con programa EPI INFO 7.

El análisis se realizó mediante análisis descriptivo cuantificando las medidas de tendencia central con sus intervalos de confianza (IC) del 95% y medidas de dispersión.

Para comparación de variables cualitativas se empleó la prueba de Chi cuadrado. Se calculó un valor significativo para p menor de 0.05.

Entre los resultados se menciona cantidad total de pacientes con sospecha clínica de infección por Mycobacterium Tuberculosis y el total de pacientes positivos a la sospecha clínica. Con porcentaje que clasifique en hombres y mujeres, con proporción. Con edad media en años. Tasa bruta de incidencia por 100,000 habitantes, así como tasa de hombres y mujeres por 100,000 habitantes. Todo representado con gráficas elaboradas en Windows Excel. Cantidad de casos diagnosticados con tratamiento ambulatorio o ingreso. Y porcentaje de tipo de muestra enviada al laboratorio para su análisis.

Sensibilidad (S):

La sensibilidad (S) de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene un enfermo de dar un resultado positivo en dicha prueba.

$$S = \frac{\text{Verdaderos positivos (vp)}}{\text{Verdaderos positivos (vp) + Falsos negativos (fn)}}$$

La especificidad (E) de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene una persona sin la enfermedad de interés de dar un resultado negativo en dicha prueba.

$$E = \frac{\text{Verdaderos negativos (vn)}}{\text{Verdaderos negativos (vn) + Falsos positivos (fp)}}$$

Valor Predictivo Positivo (VPP): EL valor predictivo positivo (VPP) de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene una persona con la prueba diagnóstica positiva de tener la enfermedad.

$$VPP = \frac{\text{Verdaderos positivos (vp)}}{\text{Verdaderos positivos (vp) + Falsos positivos (fp)}}$$

Verdaderos positivos (vp) + Falsos positivos (fp)

## V. RESULTADOS

Para la prueba de PCR (GenXpert©) se encontraron 47 casos verdaderamente positivos de los cuales 24 eran positivos con esta prueba dando una sensibilidad del 51.06% (36.06% - 65.92% IC de 95%), mientras que se encontraron 679 casos verdaderamente negativos de los cuales 642 eran negativos con esta prueba dando una especificidad del 94.55% (92.57% - 96.13% IC de 95%). Se estimó, basado en que únicamente 24 casos positivos de 61 que detectó la prueba como positivos eran verdaderamente positivos, un valor predictivo positivo de 39.34% (29.88% - 49.68% IC de 95%), sin embargo, se demostró que de 665 casos que dio como negativos, la prueba de PCR (GenXpert©) encontró 642 verdaderamente negativos dando un valor predictivo negativo de 96.54% (95.42% - 97.40% IC de 95%).

Para la prueba de Ziehl Neelsen se encontraron 47 casos verdaderamente positivos de los cuales 13 eran positivos con esta prueba dando una sensibilidad del 27.66%(15.62% - 42.64% IC de 95%), mientras que se encontraron 679 casos verdaderamente negativos de los cuales 679 eran negativos con esta prueba dando una especificidad del 100% (99.46% - 100.00% IC de 95%). Debido a que 13 casos positivos de 13 que detectó la prueba como positivos eran verdaderamente positivos se obtuvo un valor predictivo positivo de 100%, sin embargo, se demostró que de 713 casos que dio como negativos, la prueba de Ziehl Neelsen encontró 642 verdaderamente negativos dando un valor predictivo negativo de 95.23% (94.36% - 95.97% IC de 95%).

**TABLA 1. CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES, Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA CLÍNICA DE INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, RESULTADO DE PRUEBA GENXPRT**

		Gold Standard		
		Löwenstein – Jensen Positivo	Löwenstein – Jensen Negativo	TOTAL
<b>Prueba</b>	GenXpert Positivo	24	37	61
	GenXpert Negativo	23	642	665
		47	679	726

**TABLA 2. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO, VALOR PREDICTIVO NEGATIVO DE LA PRUEBA GENXPRT**

<b>Sensibilidad</b>	51.06%	36.06% - 65.92%
<b>Especificidad</b>	94.55%	92.57% - 96.13%
<b>Valor Predictivo Positivo</b>	39.34%	29.88% - 49.68%
<b>Valor Predictivo Negativo</b>	96.54%	95.42% - 97.40%

**TABLA 3. CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES, Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA CLÍNICA DE INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, RESULTADO DE PRUEBA ZIEHL NEELSEN**

		<b>Gold Standard</b>		
		Löwenstein – Jensen Positivo	Löwenstein – Jensen Negativo	TOTAL
<b>Prueba</b>	Ziehl Neelsen Positivo	13	0	13
	Ziehl Neelsen Negativo	34	679	713
		47	679	726

**TABLA 4. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO POSITIVO, VALOR PREDICTIVO NEGATIVO DE LA PRUEBA ZIEHL NEELSEN**

<b>Sensibilidad</b>	27.66%	15.62% - 42.64%
<b>Especificidad</b>	100.00%	99.46% - 100.00%
<b>Valor Predictivo Positivo</b>	100.00%	-
<b>Valor Predictivo Negativo</b>	95.23%	94.36% - 95.97%

## VI. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

Si bien se considera al método GeneXpert novedoso para el diagnóstico en todos los casos de sospecha de tuberculosis pulmonar y extra pulmonar, es el método principal, por su alta sensibilidad, en pacientes pediátricos (25). Esto sin importar el rango de edad en este grupo de pacientes. En uno de los estudios revisados se midió la relación de los grupos de edad pediátrica en 150 pacientes y los rangos de edad y la positividad de la prueba GeneXpert no fueron estadísticamente significativos, con un valor p mayor a 0.05 ( $p=0.739$ ) de igual forma resulto las relación de GeneXpert con características clínicas del paciente, dado que la "n" del presente estudio es mayor que la del estudio citado los resultados podrían ser similares o incluso carecer de menor significado estadístico.

Tomando como "Gold estándar" la prueba de cultivo Löwenstein-Jensen, los resultados del presente estudio mostraron que el 51.06% de pruebas positivas para cultivo fueron GeneXpert positivas, y 94% de las pruebas negativas para cultivo fueron negativas para GeneXpert. Estos valores de sensibilidad y especificidad son comparables con un meta análisis donde se incluyeron 4768 muestras respiratorias de pacientes pediátricos en los cuales, en comparación con el cultivo, la prueba GeneXpert muestro el 62% y 98% de sensibilidad y especificidad respectivamente.(23) Por lo que los resultados del presente estudio siguen mostrando una sensibilidad subóptima, en comparación con el cultivo, para el correcto y adecuado diagnóstico de tuberculosis a pesar de tener una alta sensibilidad en la población pediátrica. Estas proporciones podrían variar de acuerdo al tipo de muestra, ya sea expectorado o inducida y también si se trataran de otros tipos especímenes.

Por ejemplo, en un metaanálisis revisado que incluía 14 estudios en donde comparan la prueba de GeneXpert con el cultivo en especímenes como pus y tejidos, las sensibilidades y especificidades llegan hasta 96% y 85%, respectivamente. Considerando a la prueba GeneXpert altamente sensible para tuberculosis ósea y articular. (24) En cuanto a la alta especificidad mostrada en el presente estudio (98%) y debido a que hay confirmación del cultivo, sería poco probable que el número de casos falsos positivos exceda a los del cultivo. Según lo anterior, el cultivo posee una alta sensibilidad pero la rapidez de la prueba del GeneXpert sobre este, se considera para el manejo terapéutico del paciente considerando si la tuberculosis es pulmonar o extrapulmonar y el tipo de espécimen que se estudiará.

La limitación de recursos y los frotos preparados directamente de muestras de esputo para microscopía óptica convencional con tinción de ZN son los más ampliamente utilizados para diagnosticar M. Tuberculosis. Es altamente específica, pero la sensibilidad es variable (20%–80%).(15) Los resultados del presente estudio mostraron, para la prueba de Ziehl-Neelsen, una sensibilidad y especificidad del 27.6% y el 100%, respectivamente. Esta variabilidad en la sensibilidad de la prueba de microscopía se evidencia en diferentes tipos de estudios. Por ejemplo, en uno de los estudios citados compararon el cultivo con la prueba por microscopía en 2783 muestras pulmonares de pacientes adultos y de las 327 pruebas de cultivo positivas solo 154 fueron positivas por el método Ziehl-Neelsen, mostrando una sensibilidad del 47.09%. (18) Esto podría demostrar la baja sensibilidad en muestras pulmonares para microscopía y el replanteamiento de su uso para la detección de casos en áreas altamente endémicas. Este porcentaje de sensibilidad están bajo, en comparación de otros métodos, debido a que depende de la calidad de la muestra, por lo que en población pediátrica la sensibilidad podría ser aún menor, lo cual es consistente con los resultados del presente estudio a pesar de los alto de los valores predictivos positivos y negativos . Con los resultados anteriores podría decirse, que es preferible la confirmación del método de cultivo, por la sensibilidad que esta prueba plantea sobre las otras dos, a pesar de tiempo y lo relativamente poco práctico que sea.

## **6.1. CONCLUSIONES**

- 6.1.1 Se determinó que la prueba de PCR (GenXpert©) presenta una especificidad de 94.55% y un valor predictivo negativo de 94.54%, sin embargo, cuenta con una sensibilidad moderada de 51.06% y un valor predictivo positivo bajo de 37.34%.
  
- 6.1.2 Se determinó que la prueba de Ziehl Neesen presenta una especificidad de 100% y un valor predictivo negativo alto de 95.23%, sin embargo, cuenta con una sensibilidad baja de 27.66% y un valor predictivo positivo de 100%.

## **6.2. RECOMENDACIONES**

6.2.1. Se recomienda la prueba de PCR (GenXpert®) para descartar casos negativos para Mycobacterium Tuberculosis, sin embargo, se recomienda cautela al obtener resultados negativos debido a que presenta una sensibilidad moderada.

6.2.2. Se recomienda la prueba de Ziehl Neesen para tomar conductas clínicas en casos positivos, sin embargo, no se recomienda como prueba de tamizaje debido a su baja sensibilidad a pesar de su valor predictivo negativo alto, se recomienda esperar el cultivo con medio de Löwenstein Jensen.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zumla A, George A, Sharma V, Herbert RHN, Oxley A, Oliver M. The WHO 2014 Global tuberculosis report-further to go. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2015;3(1):e10–2. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70361-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70361-4)
2. Central TB Division. 2015, TB India. Dir Gen Heal Serv Minist Heal Fam Welfare, New Delhi. 2015;1–120.
3. Donald PR. Childhood tuberculosis: Out of control? *Curr Opin Pulm Med*. 2002;8(3):178–82.
4. Marais BJ, Gie RP, Obihara CC, Hesselning AC, Schaaf HS, Beyers N. Well defined symptoms are of value in the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis. *Arch Dis Child*. 2005;90(11):1162–5.
5. Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann B. Paediatric tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(8):498–510.
6. Upchurch Sweeney CR, Turner JR, Turner JR, Barrett C, Soto AV, Whang W, et al. Disease Burden. *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. 2013. 602–603 p.
7. López Ávalos GG, Prado Montes De Oca E. Classic and new diagnostic approaches to childhood tuberculosis. *J Trop Med*. 2012;2012.
8. Allen BW. *Mycobacteria*. 101:15–30.
9. Norma González Colaboradores D, Pawluk V, Elena Bonifachich D, Cristina Cerqueiro D, Sandra Inwentarz D, Elsa Bisero D, et al. Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil Comité Nacional de Neumonología. 0:159–78. Available from: <http://www.sap.org.ar/uploads/consensos/criterios-de-diagn-oacutestico-y-tratamiento-de-la-tuberculosis-infantil-nbsp2016.pdf>
10. Sharp SE, Lemes M, Sierra SG, Poniecka A, Poppiti RJ. Löwenstein-Jensen Media No Longer Necessary for Mycobacterial Isolation. 2000;770–3.
11. WHO. Molecular Line Probe Assays for Rapid Screening of Patients At Risk of Multidrug-Resistant Tuberculosis Policy Statement Molecular Line Probe Assays for Rapid Screening of. *World Heal Organ*. 2008;(June).

12. Franco-Márquez R, Franco Márquez R. Artículo de revisión Patología. 2018;56(4):249–53. Available from: [www.revistapatologia.com](http://www.revistapatologia.com)
13. Anargyros P, Astill DSJ, Lim ISL. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28(6):1288–91.
14. Oberhelman RA, Soto-Castellares G, Gilman RH, Caviedes L, Castillo ME, Kolevic L, et al. Diagnostic approaches for paediatric tuberculosis by use of different specimen types, culture methods, and PCR: A prospective case-control study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2010;10(9):612–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70141-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70141-9)
15. Ryu YJ. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: Recent advances and diagnostic algorithms. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2015;78(2):64–71.
16. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swingler G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: A prospective study. *Lancet.* 2005;365(9454):130–4.
17. Goyal R. A Comparison of Ziehl-Neelsen Staining and Fluorescent Microscopy for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *IOSR J Dent Med Sci.* 2013;8(5):05–8.
18. Shoukrie A, Alameen A, Shaban D, Alamari W, Aboguttaia N, Askar N, et al. The Yield of Sputum Smear Direct Microscopy Using Ziehl-Neelsen Stain in Comparison with Lowenstein Jensen Culture on the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Tripoli-Libya. *Mycobact Dis.* 2018;08(01):8–11.
19. Elhassan MM, Elmekki MA, Osman AL, Hamid ME. Challenges in diagnosing tuberculosis in children: A comparative study from Sudan. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2016;43:25–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.006>
20. Chow F, Espiritu N, Gilman RH, Gutierrez R, Lopez S, Escombe AR, et al. La cuerda dulce - A tolerability and acceptability study of a novel approach to specimen collection for diagnosis of paediatric pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2006;6:1–8.
21. Thomas TA. Tuberculosis in Children. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. 2017;64(4):893–909. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.010>

22. Chakravorty S, Dudeja M, Hanif M, Tyagi JS. Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2703–8.
23. Detjen AK, DiNardo AR, Leyden J, Steingart KR, Menzies D, Schiller I, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2015;3(6):451–61.
24. Yu G, Zhong F, Ye B, Xu X, Chen D, Shen Y. Diagnostic Accuracy of the Xpert MTB/RIF Assay for Lymph Node Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2019;2019:76–90.
25. Pandey D, Yadav A. Efficacy of gene xpert over other diagnostic modalities of tuberculosis among children. *Int J Contemp Pediatr.* 2019;6(4):1545.
26. Shakak AO, Khalil EAG, Musa AM, Salih KAEM, Bashir AEA, Ahmed AH, et al. Prevalence of latent tuberculosis infection in Sudan: A case-control study comparing interferon- $\gamma$  release assay and tuberculin skin test. *BMC Public Health.* 2013;13(1):2–7.
27. Marcy O, Ung V, Goyet S, Borand L, Msellati P, Tejiokem M, et al. Performance of Xpert MTB/RIF and Alternative Specimen Collection Methods for the Diagnosis of Tuberculosis in HIV-Infected Children. *Clin Infect Dis.* 2016;62(9):1161–8.

## PERMISO DEL AUTOR PARA COPIAR EL TRABAJO

El autor concede permiso para reproducir total o parcialmente y por cualquier medio la tesis titulada: **“CORRELACIÓN DE RESULTADOS DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MOLECULARES, Y MICROBIOLÓGICOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SOSPECHA CLÍNICA DE INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS”** para propósitos de consulta académica. Sin embargo, quedan reservados los derechos de autor que confiere la ley, cuando sea cualquier otro motivo diferente al que se señala lo que conduzca a su reproducción o comercialización total o parcial.