



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE PARÁMETROS
INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL
ESTUDIO DEL PACIENTE PEDIÁTRICO CON
SOSPECHA DE TUBERCULOSIS PULMONAR**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

**PRESENTA
MÓNICA ADRIANA ASTURIZAGA MALLEA**

**TUTORA
DRA. MARIA DOLORES CORREA BELTRÁN**
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**COLABORADORES
DR. ALEJANDRO GUTIERREZ ESCOBAR
DR. FRANCISCO CUEVAS SCHACHT
DR. IGNACIO MORA MAGAÑA
DR. LORENZO PEREZ FERNANDEZ†
DRA. YEVEL FLORES GARCIA**

TODOS DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

México, DF, Diciembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

1. Resumen estructurado.....	4
2. Marco teórico	6
a. Fisiopatología e inmunología de la infección por <i>M. tuberculosis</i>	6
b. Diagnóstico de la tuberculosis en el paciente pediátrico	7
3. Planteamiento del problema	13
4. Justificación.....	14
5. Pregunta de investigación.....	14
6. Objetivos	14
a. Objetivo general.....	14
b. Objetivos particulares primarios.....	14
c. Objetivos particulares secundarios	14
7. Clasificación de la Investigación	14
8. Metodología	14
a. Lugar de realización del estudio	14
b. Población de estudio.....	14
c. Tiempo	15
d. Criterios de inclusión.....	15
e. Criterios de exclusión.....	15
f. Criterios de eliminación.....	15
g. Tamaño de la muestra	15
h. Definiciones operacionales	16
i. Descripción general del estudio	18
9. Análisis estadístico.....	20
10. Aspectos éticos	20
11. Resultados	21
a. Características demográficas.....	22
b. Características clínicas	22
c. Características epidemiológicas	23
d. PPD.....	23
e. Características radiográficas	24
f. Cultivo y baciloscopías	25
g. PCR de punto final.....	25
h. ELISA.....	26

g. QuantiFERON-TB Gold	29
h. Citocinas Th1 y Th2	32
i. Utilidad diagnóstica de las pruebas probadas.....	37
12. Discusión.....	37
13. Conclusiones.....	40
14. Referencias	40
15. Anexo 1: Definiciones de los resultados positivos del PPD	46
16. Anexo 2: Toma de muestra para cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	47
17. Anexo 3: Transporte de las muestras	49
18. Anexo 4: Tratamiento.....	50
19. Anexo 5: Carta de consentimiento informado	51
20. Anexo 6. ELISA para <i>M. tuberculosis</i>	55
21. Anexo 7. QuantiFERON- TB Gold y cuantificación de citocinas.....	56
22. Anexo 8. Hoja de recolección de datos.....	57

1. Resumen estructurado

Planteamiento del problema: A pesar de que la tuberculosis es una enfermedad cuya prevalencia ha disminuido, sigue siendo un problema de salud por la morbilidad y mortalidad asociadas. Pese al gran esfuerzo por desarrollar técnicas de alta sensibilidad y especificidad, aún no se ha encontrado un método rápido y de bajo costo, con altos valores diagnósticos y que tenga aplicación en el paciente pediátrico. Por lo tanto, se plantea la necesidad de realizar un estudio de prueba diagnóstica que evalúe estos nuevos procedimientos, para que pueda brindar al clínico una herramienta útil.

Pregunta de investigación: ¿Cuál es la utilidad diagnóstica de parámetros inmunológicos (ELISA, ensayos de interferón-gamma) y moleculares (PCR en punto final) en el estudio de paciente pediátrico, menor de 8 años con sospecha de tuberculosis pulmonar?

Justificación: Es necesario conocer la utilidad de las pruebas diagnósticas disponibles en la actualidad para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en el paciente pediátrico, en especial en niños menores de 8 años, que por sus características inmunológicas y clínicas dificultan su abordaje; con esto se puede brindar un diagnóstico oportuno y de certeza para iniciar el tratamiento precoz y así disminuir la morbilidad y la mortalidad.

Objetivo: Determinar la utilidad diagnóstica de parámetros inmunológicos (ELISA, ensayos de interferón-gamma) y moleculares (PCR en punto final) en el estudio de paciente pediátrico menor de 8 años con sospecha de tuberculosis pulmonar.

Diseño metodológico: Es un estudio de prueba diagnóstica en los Servicios de Neumología e Infectología del Instituto Nacional de Pediatría y el Servicio de Pediatría del Hospital de General de México en pacientes pediátricos menores de 8 años edad con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar y pacientes con neumopatía crónica. El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a la fórmula de Buderer, requiriendo un mínimo de 320 pacientes.

Se define como paciente con sospecha clínica de tuberculosis aquel que presente antecedentes epidemiológicos, cuadro clínico y radiografía compatibles; con tuberculosis pulmonar confirmada aquel con cultivo, baciloscopia o estudio anatomopatológico positivos; con tuberculosis pulmonar probable, el que no cuente con un cultivo o baciloscopia positivas o estudio anatomopatológico compatible pero que tenga la prueba terapéutica positiva.

Descripción del estudio: En ambos grupos se realiza una historia clínica completa, que incluye antecedentes epidemiológicos y de vacunación contra BCG, una teleradiografía de tórax y se les aplica el PPD. Se realiza cultivo en Lowenstein-Jensen y PCR en punto final en aspirado gástrico, esputo inducido o lavado bronquioalveolar, ELISA y QuantiFERON- TB Gold en sangre periférica. En los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar se inicia tratamiento antifímico, al terminar la primera fase del tratamiento, se valora clínica y radiológicamente para valorar la respuesta a la prueba terapéutica.

Análisis estadístico: En el *descriptivo* se analizaron las variables demográficas y clínicas, evaluando su distribución. Para el análisis de la *prueba diagnóstica* se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, cocientes de probabilidad (+), cocientes de probabilidad (-).

Resultados: Se reclutaron 26 niños, 2 niños con tuberculosis pulmonar confirmada, 14 con tuberculosis pulmonar probable y 10 con tuberculosis pulmonar descartada. No hubo diferencia significativa entre los grupos en relación a la edad, sexo, procedencia y antecedente de BCG. La prueba de PPD fue positiva en 0.73 para el grupo de tuberculosis pulmonar y 0.20 en el grupo control (P 0.109).

Los valores de utilidad diagnóstica para la PCR fue de 0.12 de sensibilidad y de 1 de especificidad, ya que solo dos niños tenían la prueba positiva. El ELISA para *M.*

tuberculosis con el punto de corte de 0.229 tiene una sensibilidad de 0.37 y especificidad de 0.80, sin embargo si se modifica el punto de corte a 0.114 la sensibilidad cambia a 0.68, sin modificar la especificidad. La interpretación de los resultados de acuerdo al QTF-TB Gold establece como punto de corte 0.35; sin embargo al considerar una prueba positiva tan solo la presencia de IFN- γ , se modifican los parámetros de utilidad diagnóstica, cambiando la sensibilidad de 0.43 a 0.83 y la especificidad de 0.79 a 0.77. Al comparar la distribución de las citocinas entre los grupos, solo se encuentra diferencia significativa con IFN- γ (P 0.003) y tendencia a la significancia en IL-10 (P 0.069). Analizando solo los casos de TBP, se encontró diferencia significativa en la distribución de TNF- α con relación a la tos (P 0.048), IL-10 con relación a la pérdida de peso (p 0.015) y tendencia a la significancia en la distribución de TNF- α con relación a la fiebre (p 0.073). Al relacionar el estado de gravedad con las citocinas, se encontró diferencia significativa en IL-2 (P 0.012) e IL-8 (P 0.006) y tendencia a la significancia en TNF- α (P 0.069) y IL-6 (P 0.058).

Conclusiones: Aunque el tamaño de la muestra es parcial y aún se está llevando a cabo el estudio, podemos sacar conclusiones preliminares. El PPD tiene valores de utilidad diagnóstica mayores que las otras pruebas. El ELISA tiene valores de utilidad diagnóstica por lo que podría ser una prueba inicial en el abordaje, además de ser accesible. La utilidad diagnóstica del QTF-TB Gold es similar a la reportada en la literatura, sin embargo al modificar el punto de corte para niños podría incrementar estos valores y ser una herramienta de mayor beneficio. El porcentaje de muestras positivas por PCR es muy bajo, menor a lo que se reporta en la literatura; que podría deberse a las características clínicas del paciente pediátrico; sugiriendo que esta prueba podría no ser aplicable en niños.

2. Marco teórico

Hoy en día, la tuberculosis aún es una enfermedad cuya trascendencia persiste; a pesar de los avances en su diagnóstico y tratamiento sigue siendo una causa de morbimortalidad importante, especialmente en países en vías de desarrollo (1,2). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incidencia de tuberculosis en México, para el 2011 fue de 17/100.000 habitantes (3). En 2008, el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología/Secretaría de Salud de México (SUIVE/DGE) informaron la incidencia para tuberculosis (TB) pulmonar en pacientes pediátricos que se detalla en el Cuadro 1 (4). En el 2009 la OMS informó que los casos en pacientes menores de 15 años sólo corresponden al 3% en México (2), mientras que el Centro Nacional de Prevención y Control de Enfermedades del Gobierno Federal de la Secretaría de Salud, informó que la tuberculosis en este grupo de edad corresponde al 4.9% (5). En el último informe de la OMS se reportan 264 casos con baciloscopia positiva en menores de 14 años en el año 2011(2). En el Instituto Nacional de Pediatría, en el periodo del 2005 al 2010, se han atendido 78 pacientes con diagnóstico de TB pulmonar.

Es importante mencionar que el incremento de la prevalencia de la TB, durante los años 80' está en relación con la pandemia del VIH/SIDA, que la prevalencia del VIH/ SIDA se estabilizó durante el 2009 y que el 8% de los pacientes con tuberculosis tienen VIH/SIDA (1,2).

Cuadro 1. Incidencia de Tuberculosis en 2010 (por 100,000 habitantes)

Menores de un año	3.63
1 a 4 años	1.28
5 a 9 años	1.02
10 a 14 años	1.89
15 a 19 años	8.92

Fuente: SUIVE/DGE (2010)

a. Fisiopatología e inmunología de la infección por *M. tuberculosis*

Para comprender el fundamento de las pruebas inmunológicas, es necesario conocer la inmunopatogenia de la tuberculosis. Una vez que los bacilos superan los mecanismos de defensa propios del aparato respiratorio, llegan al espacio alveolar, donde los macrófagos procesan y presentan los antígenos micobacterianos a los linfocitos T. Los macrófagos alveolares procesan los antígenos en el fagolisosoma y los transportan a la superficie. Los antígenos, para ser reconocidos, deben unirse a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); si lo hacen a las moléculas de MHC clase I inducen la proliferación de los linfocitos T citotóxicos, o CD8+; y si se unen al MHC-clase II inducirán predominantemente la formación de linfocitos T CD4+, o Th = cooperadores (6-9); además, los macrófagos secretan citocinas o interleucinas (IL), las más importantes son: IL-1, IL-12, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e interferón- α (IFN- α). Las células T reconocen el antígeno a través de un receptor en su superficie (de cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$). En presencia de IL-12, se desencadena una respuesta Th1, con producción de IL-2, IFN γ - y TNF- β . El INF- γ secretado activa a los macrófagos infectados para destruir a los bacilos

que se encuentran en su interior y a los linfocitos B para producir anticuerpos de clase IgG1, IgG3 e IgA. Si la presentación de antígenos ocurre en un ambiente de IL-4, se producirá una respuesta Th2, con secreción de IL-4, 5, 6, 9, 10 y 13, que estimularán a los linfocitos B para inducir la producción de anticuerpos de clase IgE, IgG2 e IgG4 (6-10).

La infección por *M. tuberculosis* produce la secreción de grandes cantidades de IFN- γ y bajas concentraciones de IL-4 e IL-5. El IFN- γ , en combinación con el TNF- β , aumenta la actividad de los macrófagos, los cuales liberan gran cantidad de TNF- α , que es el responsable de la necrosis caseosa en el centro de los granulomas y también de la fiebre y adelgazamiento, así como de la necrosis en la reacción cutánea a la tuberculina (6-10).

b. Diagnóstico de la tuberculosis en el paciente pediátrico

El estudio analítico y deductivo de la tuberculosis inició en la llamada Era Hipocrática cuando el propio Hipócrates describió varias formas clínicas de tisis o consunción; algunas de ellas asociadas a expectoración de sangre, muy probablemente correspondieron a tuberculosis pulmonar (11). El conocimiento científico de esta enfermedad se inició con la transición de la edad media a la edad moderna ocurrida entre los siglos XIV y XVI, cuando Teófilo Laë nec (1781-1826) concibió la teoría unicista de la tuberculosis, entre otras muchas aportaciones (11,12). Ranke (1870-1926) describió las tres etapas evolutivas de la tuberculosis pulmonar: la primoinfección tuberculosa o chancro de inoculación pulmonar, la diseminación hemática del germen o bacilemia y la siembra de la infección en diferentes órganos de la economía, lo cual explica la tuberculosis pulmonar y la extrapulmonar. Von Pirquet (1874-1929) y Mantoux desarrollaron la aplicación de la tuberculina como herramienta diagnóstica para la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Roberto Koch (1843-1919) aisló por primera vez el *M. tuberculosis* y Ziehl y Neelsen (1882) describieron una técnica de coloración que permite identificar rápidamente el bacilo de la tuberculosis en cualquier producto, básicamente en el esputo. Junto con el descubrimiento de la radiología (1899) y el primer fármaco antifímico (1936) la estreptomycin, el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis fue evolucionando. Este conocimiento de la historia permite fundamentar los criterios que sustentan el proceso diagnóstico y terapéutico de la tuberculosis, en el siguiente orden cronológico: clínica, epidemiología, anatomopatología, bacteriología, inmunología, radiología y terapéutica (11,12). Es ineludible mencionar que los métodos bacteriológico y anatomopatológico son considerados como las pruebas de referencia, aun hoy en día (1).

Este conocimiento descrito en población adulta no siempre aplica cuando se trata de extrapolar al paciente pediátrico; por ejemplo: la expresión clínica de la enfermedad, además de polimórfica e inespecífica, es sustancialmente diferente; de hecho corresponde a una bacilemia con frecuente participación meningoencefálica (6-9). Las formas de diseminación linfohematógena que son prevalentes en el niño, no son bacilíferas, por lo que se dificulta la recuperación del agente patógeno en las secreciones y excreciones corporales (6,7,13-18). El aparato inmune del niño al nacimiento es completo en lo orgánico pero su competencia funcional se desarrolla con el crecimiento, a medida que adquiere experiencia inmunológica natural o inducida por vacunas; de esta manera se explica que el paciente pediátrico -en especial el niño menor de 7 años- tiene mayor riesgo de desarrollar la forma meníngea o miliar; también por ello las pruebas inmunológicas presentan menor sensibilidad que en el paciente adulto (7-8,13-15).

Para tratar de solucionar los problemas que plantea el paciente pediátrico, Stegen y Kaplan idearon en 1967 los llamados sistemas de puntaje en los cuales se asigna un valor aritmético a cada uno de los parámetros clínicos, de imagen y de laboratorio, indicados en

el proceso diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, y con base en sumas y restas obtuvieron un resultado que les permitió: a) descartar tuberculosis, b) continuar su investigación, c) justificar el tratamiento de prueba o d) establecer el diagnóstico de certeza (19). En México, Toledo informó en 1976 una modificación a este sistema que permitió establecer el diagnóstico de certeza en el 93.4% de los niños estudiados en un hospital de concentración de enfermedades pulmonares (20). Dicho sistema de puntaje sigue siendo una herramienta vigente de diagnóstico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Criterios para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en el niño

Aislamiento de BAAR	7 puntos
Granuloma específico	4 puntos
PPD Positivo con 10 mm o más	3 puntos
Antecedente epidemiológico de contacto TB	2 puntos
Radiografía de tórax sugerente	2 puntos
Cuadro Clínico Compatible	3 puntos
Antecedente de vacunación BCG	-2 puntos
Hasta 2 puntos	No es tuberculosis
De 3 a 4 puntos	El diagnóstico de tuberculosis es posible y deberá investigarse a fondo
De 5 a 6 puntos	El diagnóstico es factible y amerita prueba terapéutica
De 7 o más puntos	El diagnóstico es de certeza

Stegen, Kaplan, Toledo, 1976; BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente; PPD: Derivado proteico purificado; TB: tuberculosis

En 1984, se realizó un primer trabajo de investigación clínica, en el cual se estudió este sistema de puntaje en pacientes referidos al Instituto Nacional de Pediatría, hospital pediátrico de tercer nivel de atención médica, encontrándose un importante margen de error; además, no tuvo aplicación práctica porque varios de los estudios diagnósticos que se valoran no se solicitan por el médico tratante sistemáticamente, sino hasta que se tiene un alto índice de sospecha. Estos sistemas son altamente específicos puesto que no dejan margen para obtener resultados falsos positivos. Dicho en otras palabras, los sistemas de puntaje son bastante sensibles cuando se aplican a una población seleccionada que se atiende por síntomas predominantemente respiratorios y que es estudiada por especialistas neumólogos sensibilizados para investigar tuberculosis; sin embargo, en la población que asiste a un hospital pediátrico donde se atiende una población más heterogénea de pacientes, que incluyen casos probablemente tuberculosos, pacientes tuberculosos con graves enfermedades asociadas y pacientes neumópatas crónicos no tuberculosos, los sistemas de puntaje permiten apoyar el diagnóstico de tuberculosis, pero no son de gran ayuda en los casos graves, atípicos o de difícil diagnóstico, que son frecuentes en la edad pediátrica (21). En ese estudio se fijó como segundo objetivo determinar la sensibilidad y la especificidad de los criterios del sistema de puntaje propuesto por Stegen- Kaplan- Toledo, de manera que se pueda informar al médico tratante la utilidad diagnóstica de estos elementos. Los resultados mostraron que: a) el cuadro clínico es moderadamente sensible pero inespecífico; b) la radiografía simple de tórax en proyección anteroposterior es el parámetro más sensible y específico; c) el cultivo en Lowenstein-Jensen (LJ) para *M. tuberculosis* y la intradermoreacción al Derivado Proteico Purificado (PPD) son altamente específicos,

aunque son de baja sensibilidad. La radiografía de tórax, el antecedente de vacunación con BCG y el cuadro clínico en conjunto presentaron sensibilidad entre 0.68 y 0.78 y especificidad entre 0.65 y 0.86, respectivamente (21) (Cuadro 3).

En un tercer trabajo de investigación se evaluó la respuesta inmune-celular a través de la intradermorreacción con PPD y la respuesta humoral a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, por ensayo inmunoenzimático (ELISA) y contraelectroforesis (CIE). Se estudiaron niños con tuberculosis pulmonar comprobada, niños con tuberculosis pulmonar no comprobada y niños neumópatas crónicos en los cuales se descartó tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. La serie se dividió en pacientes vacunados con BCG y no vacunados. La intradermorreacción al PPD mostró baja positividad en niños con tuberculosis pulmonar comprobada y en no tuberculosos vacunados con BCG, lo cual se explica en función de la poca capacidad de respuesta inmune del niño, o bien por defectos en la aplicación del biológico. La CIE fue positiva en el 50% de los niños con tuberculosis pulmonar comprobada. Se encontró además una reacción cruzada con BCG en los niños vacunados. Estos resultados difieren de lo informado en el adulto. Esta prueba detectó a todos los pacientes con tuberculosis pulmonar comprobada o no comprobada en un umbral de 0.8 de absorbancia y los niños no tuberculosos y no vacunados los valores del ELISA se encontraron por abajo del umbral de corte. En el grupo de niños no tuberculosos pero vacunados con BCG se observó reacción cruzada, lo cual plantea la necesidad de investigar un antígeno específico para *M. tuberculosis*.

Cuadro 3. Valor de los parámetros en el estudio del niño con TB pulmonar

	Grupo I	Grupo II	Grupo III
	TBP clínica (n=170)	TBP Autopsia (n=70)	Neumopatía crónica/ No TB (n=50)
Estudio	Sensibilidad		Especificidad
Radiografía de tórax	0.78	0.7	0.86
Paciente no vacunado con BCG	0.72	0.76	0.65
Cuadro clínico	0.68	0.7	0
PPD	0.66	0.39	0.98
Antecedentes epidemiológicos (contacto con enfermo TB)	0.55	0.74	0.95
Baciloscopia	0.39	0.36	1

Pérez- Fernández, 1984 TBP: Tuberculosis pulmonar, PPD: Derivado proteico purificado, TB: Tuberculosis

En estos dos últimos estudios se incluyeron neumópatas crónicos, es decir pacientes que presentan síntomas respiratorios de manera continua por seis meses o que tuvieron por lo menos 6 episodios recurrentes durante los últimos 12 meses, que ya han sido estudiados por un médico general o pediatra, antes de referirse al neumólogo pediatra; por lo tanto este grupo de pacientes representa un reto diagnóstico (21,22).

En las últimas tres décadas se han informado revisiones bibliográficas de nuevos procedimientos bacteriológicos, inmunológicos y moleculares que pretenden resolver el problema del diagnóstico con certeza y rapidez en el paciente con sospecha de tuberculosis pulmonar; sin embargo, los estudios con casos pediátricos son escasos (12,16-18,23-27). La gran cantidad de información al respecto y su nivel esencialmente básico, plantean al clínico la necesidad de conocer la gradación científica y el nivel de evidencia de estos informes y su aplicación en el paciente pediátrico (28). Los métodos

diagnósticos descritos son el cultivo en medio líquido (BACTEC), la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para *M. tuberculosis*, el sistema automatizado no radiométrico usando medio de cultivo líquido (MGIT), los ensayos de interferón gamma (T-SPOT.TB y QuantiFERON- TB), el sistema de cultivo colorimétrico, las pruebas basadas en bacteriófagos, el ensayo de susceptibilidad a drogas por observación microscópica (MODS), las pruebas para resistencia, por PCR, y las pruebas serológicas basadas en antígenos específicos (ELISA) (12, 16-18, 23-27).

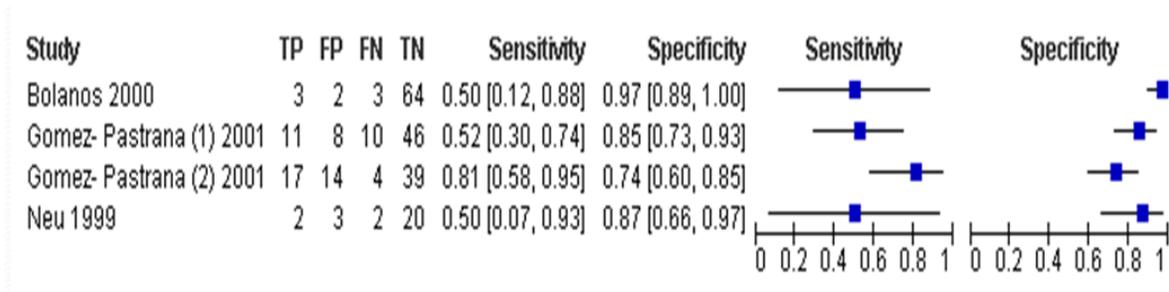
En el 2009 se realizó una revisión sistemática en el Instituto Nacional de Pediatría, cuyo objetivo fue conocer la utilidad de las nuevas pruebas diagnósticas reportadas en la literatura, en comparación con los procedimientos considerados de referencia (pruebas de oro): el cultivo LJ, baciloscopía positiva y el estudio anatomo-patológico, en el estudio del niño con probable tuberculosis pulmonar o confirmada. Se incluyeron los artículos de prueba diagnóstica que comparaban cualquiera de las pruebas citadas en el párrafo anterior con las pruebas de referencia, realizadas en una población pediátrica de 0 a 18 años. Se buscaron en las bases de datos PubMed, Artemisa, EMBASE, LILACS; con términos MESH de "pulmonary tuberculosis" y de cada prueba. Se encontraron 269 artículos, de los cuales 213 no fueron considerados para la revisión por las siguientes razones: se encontraban realizados en adultos, no tenían como prueba de referencia baciloscopía positiva, cultivo LJ o estudio anatomopatológico o no eran estudios de prueba diagnóstica. De los 56 artículos restantes, fueron excluidos 53, 10 de ellos teniendo como población niños y adultos mezclados, por lo que no permitían extraer los datos de los niños. Trece artículos no se pudieron descargar o solicitar, la mayoría se encontraban en chino, japonés, ruso y rumano; 21 artículos no tenían como referencia la baciloscopía, el cultivo LJ o el estudio anatomopatológico; 6 fueron artículos repetidos; en 2 artículos no se pudo armar la tabla de 2x2 y un artículo no era de prueba diagnóstica. De los 10 artículos que tenían como población niños y adultos, se intentó separar los datos de adultos y niños, se envió un correo electrónico a los autores de 8 artículos que tenían disponible el correo electrónico, contestaron cinco (Khan 2006, Figueirêdo 2009, Singh 2008, Greenaway 2005, Minh 2009) pero ninguno envió los datos solicitados (no tenían la base de datos disponible por cambio de domicilio, utilizaron otro tipo de prueba diagnóstica de referencia, o utilizaron una base de datos prestada). De igual manera se envió el correo electrónico a los autores de los 2 artículos en los que no se pudo armar la tabla de 2x2, pero no obtuvimos respuesta (28).

Cuadro 4. Calidad metodológica de los artículos incluidos

	Neu 1999	Gómez-Pastrana 2001	Bolaños 2000	Total
Edad	3.9años	NR	< 15años	
Número de pacientes	27	72	25	124
Número de muestras	17	135	74	226
Tipo de muestra	Aspirado gástrico	Aspirado gástrico, LAB	Aspirado gástrico, esputo	
Prueba de interés	PCR	PCR	PCR	
Prueba de comparación	LJ	LJ	LJ	
Tiempo	NR	NR	32 vs 4días	
Costo	NR	NR	NR	
Lugar	USA	España	España	
STARD	5.44	7.12	5.48	
QUADAS	6.42	8.07	6.78	

NR= no se reportó; PCR= reacción en cadena a la polimerasa; LJ= medio Lowestein Jensen; LAB= lavado bronquioalveolar; USA= Estados Unidos de América

Los tres artículos incluidos tuvieron una calidad metodológica pobre, pues tenían como prueba de interés la PCR en esputo y como prueba de referencia el cultivo LJ, encontrando que su sensibilidad es baja (alrededor del 0.5) y su especificidad alta (alrededor del 0.9) (Cuadro 4 y gráfica 1). Los resultados de esta revisión bibliográfica tienen importancia en el ámbito clínico porque permiten debatir los parámetros de utilidad diagnóstica reportados en la literatura para estas pruebas en pacientes pediátricos; infiriendo que el campo de estudio de la tuberculosis pulmonar en el niño es aún virgen, pues aún no se resuelve la necesidad de un método rápido y de alta capacidad diagnóstica. La escasez de publicaciones con alto rigor metodológico para identificar la tuberculosis pulmonar en el particular ámbito de la población pediátrica, destaca la urgencia de realizar estudios prospectivos (28-31).



Gráfica 1. Sensibilidad y especificidad de los tres artículos de PCR
Gráfica de Forest plot

NAAT (Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos)

Este método fue muy popular y de elección durante la década de los 90s: sin embargo, lo variado de la metodología, y los altos costos lo hicieron caer en desuso.

Son varias las técnicas que se agrupan bajo el nombre de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos: PCR, transcripción mediada por amplificación, amplificación por desplazamiento.

La PCR puede ser de punto final (estándar) o en tiempo real; la diferencia está en que la última, además de amplificar una secuencia específica, es cuantitativa. Ambas son pruebas altamente sensibles, porque pueden detectar un número reducido de copias de

ácido nucléico; además son rápidas, y son relativamente fáciles de realizar, pero requieren infraestructura especial y son costosas (17, 18, 32).

La PCR en punto final, tanto comercial como casera, ha sido extensamente evaluada en pacientes adultos, informándose una especificidad de 0.85 a 0.98 y alta sensibilidad para la tuberculosis con baciloscopía positiva (de 0.96) pero más baja en pacientes con baciloscopía negativa, aproximadamente 0.66. Este último valor de sensibilidad es similar al encontrado en la tuberculosis pulmonar en niños, en la revisión sistemática presentada, ya que los niños no son bacilíferos. La PCR en tiempo real se ha evaluado en pacientes adultos, encontrando una especificidad y sensibilidad 1.00 y 0.97, respectivamente; no existen datos en pacientes pediátricos. Se ha descrito una nueva PCR de tiempo real que además diagnostica la resistencia a la rifampicina: Xpert MTB/RIF. Hay un estudio en pacientes pediátricos, en el cual se comparó con el cultivo, encontrando 6% de 452 niños con baciloscopías positivas, 16% con cultivo positivos y 13% con Xpert MTB/RIF positivo; determinando una especificidad de 0.98 y una sensibilidad de 0.58; muy similar al PCR de punto final (32-35).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Los estudios serológicos detectan anticuerpos contra antígenos de *M. tuberculosis*; que se extraen del bacilo Calmett Guerin y que incluyen el de 38kDa, el de 60 kDa y el lipoarabinomano (36).

Las ventajas de este método son que no requiere un laboratorio sofisticado, puede ser usado como punto de partida; tampoco requiere esputo, es una prueba rápida y simple, los resultados están disponibles en 3 a 4 horas y es relativamente barata; pero es un método indirecto, de utilidad diagnóstica variable pues frecuentemente presenta falsos positivos y falsos negativos y no ofrece información cuantitativa ni de resistencia (36).

En el 2001, Imaz realizó un estudio para evaluar el antígeno recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* de 15kDa en el diagnóstico de tuberculosis en niños. Incluyó niños con TB activa, contactos sanos y niños con enfermedades no micobacterianas. Se realizó la detección de IgG, IgM e IgA específicas por ELISA, y se reportó una sensibilidad entre 0.03 y 0.35, por lo que concluyó que la detección de IgG e IgA puede ser usada como complemento en el diagnóstico de tuberculosis en el niño. Lagrange realizó una revisión sistemática para determinar la utilidad diagnóstica del ELISA, incluyendo 13 estudios, en los que la población tenía TB activa (aunque no se especifica que sea para TB pulmonar), encontrando una especificidad mayor a 0.9, pero una sensibilidad inconsistente, entre 0.26 y 0.86 (37,38) (Cuadro 5).

Ensayos de interferón gamma (IGRAs)

Es el método de elección actual para el diagnóstico de TB latente. Este método mide el IFN- γ en respuesta al "ESAT-6" (Early secret antigenic target 6) o al "CFP-10" (*culture filtrate protein- 10*)(18).

Existen 2 pruebas: QuantiFERON- TB (QFT) que cuantifica las concentraciones de la citocina en respuesta a ESAT- 6, CFP-10 y TB 7.7 por ELISA; mientras que la T- Spot TB cuantifica las células T productoras de IFN- γ en respuesta a los mismos antígenos (12,18, 36, 39). La ventaja de este método es que usa antígenos específicos ausentes en la vacuna BCG y en otras micobacterias, no requiere esputo, el resultado es objetivo (se puede calcular un punto de corte por medios matemáticos) y la obtención de resultados es rápida, en menos de 24 horas; pero es un método costoso y requiere personal entrenado e infraestructura, no puede distinguir enfermedad latente de enfermedad activa, tiene un valor predictivo modesto para progresión a tuberculosis activa. Además, su especificidad es alta pero su sensibilidad es subóptima. Por otro lado, al ser un método indirecto no

brinda información sobre resistencia. La sensibilidad reportada en la literatura es de 0.58 a 0.80 para el QTF y de 0.62 a 0.93 para el T- Spot TB; la especificidad de QTF es de 0.98 y de T-Spot TB de 0.92 (12, 18, 39).

En 2011 se publicó una revisión sistemática de los IGRAS, en la que se incluyeron estudios donde la población con TB activa, sin embargo incluyen niños con TB pulmonar y extrapulmonar, se informan valores de sensibilidad entre 0.47 y 0.93 y especificidad entre 0.84 y 1.0 (36).

Se publicó otra revisión sistemática en la que se evaluaron dos pruebas, el QTF y el PPD; donde buscaron bases de datos de artículos entre enero de 2000 y enero de 2011, usando los términos de búsqueda como infección por tuberculosis, tuberculosis latente, interferón gamma, T-SPOT.TB test, QTF, ESAT-6, CFP-10, niños, e infancia o pediátrico, La sensibilidad para TB latente fue de 0.70 para QTF, 0.62 para ELISPOT y 0.71 para el PPD. Las sensibilidades calculadas para el QTF y el PPD difieren por tuberculosis confirmada por cultivo, QTF 0.64, ELISPOT 0.58 y PPD 0.66. La especificidad para ambas pruebas fue de 1.00, mientras que para el PPD fue de 0.56. En niños con tuberculosis activa la sensibilidad fue similar entre ambas pruebas de ensayos de interferón gamma (40)(Cuadro 5).

Cuadro 5. Sensibilidad y especificidad de PCR, ELISA y QuantiFERON- TB

Técnica	Edad	Tuberculosis	Sensibilidad	Especificidad
PCR	< 18años	Pulmonar	0.50-0.81	0.74-0.97
	< 18años	Pulmonar/extrapulmonar	0.47-0.93	1.00
QuantiFERON-TB	< 18años	Pulmonar/extrapulmonar	0.57-0.67	0.84-1.00
	<14 años	Pulmonar/extrapulmonar	0.26-0.88	0.38-1.00
ELISA (Varios antígenos)	<14 años	Pulmonar/extrapulmonar	0.26-0.88	0.38-1.00
ELISA (Extracto proteico soluble de H37Rv)	Adultos	Pulmonar	0.70	0.94

3. Planteamiento del problema

A pesar de que la tuberculosis es una enfermedad cuya prevalencia ha disminuido, sigue siendo un problema de salud por la morbilidad y mortalidad asociadas. Pese al gran esfuerzo de desarrollar técnicas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad, aún no se ha encontrado un método rápido y de bajo costo, con altos valores diagnósticos y que tenga aplicación en el paciente pediátrico.

Se han informado procedimientos bacteriológicos, moleculares e inmunológicos para el diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en pacientes adultos, pero la mayoría de los estudios en pacientes pediátricos no se comparan con la prueba de referencia, o bien no tienen la gradación científica o el nivel de evidencia adecuados.

El cultivo LJ, como prueba de referencia, no siempre es útil en los pacientes pediátricos porque son paucibacilares por sus características fisiopatológicas. Además, para determinar si el cultivo LJ es positivo, se debe realizar la lectura hasta en 8 semanas, lo que retrasa el diagnóstico (1).

Por lo tanto, se plantea la necesidad de realizar un estudio de prueba diagnóstica que evalúe estos nuevos procedimientos; para que pueda brindar al clínico una herramienta útil.

4. Justificación

El contar con una herramienta que permita realizar el diagnóstico rápido y de certeza es trascendental porque la tuberculosis no ha dejado de ser un problema de salud pública, especialmente con la emergencia del VIH.

Es necesario conocer la utilidad de las pruebas diagnósticas disponibles en la actualidad para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en el paciente pediátrico, en especial en niños menores de 8 años, que por sus características inmunológicas y clínicas dificultan su abordaje; con esto se puede brindar un diagnóstico oportuno y de certeza para iniciar el tratamiento precoz y así disminuir la morbilidad y mortalidad.

Los resultados de este estudio no sólo van a beneficiar a los pacientes pediátricos y neumólogos e infectólogos pediatras, sino también al pediatra y médico general, que se enfrenta con este problema diagnóstico.

5. Pregunta de investigación

¿Cuál es la utilidad diagnóstica de parámetros inmunológicos (ELISA, ensayos de interferón-gamma) y moleculares (PCR en punto final) en el estudio de paciente pediátrico menor de 8 años con sospecha de tuberculosis pulmonar?

6. Objetivos

a. Objetivo general

Determinar la utilidad diagnóstica de parámetros inmunológicos (ELISA, ensayos de interferón-gamma) y moleculares (PCR en punto final) en el estudio de paciente pediátrico menor de 8 años con sospecha de tuberculosis pulmonar.

b. Objetivos particulares primarios

Determinar la utilidad diagnóstica de la PCR en punto final para *M. tuberculosis*.

Determinar la utilidad diagnóstica del ensayo de interferón-gamma (QuantIFERON- TB Gold).

Determinar la utilidad diagnóstica de ELISA para *M. tuberculosis*.

c. Objetivos particulares secundarios

Determinar el patrón de respuesta Th1 y Th2 en el paciente pediátrico menor de 8 con tuberculosis pulmonar.

7. Clasificación de la Investigación

Estudio de evaluación de pruebas diagnósticas

8. Metodología

a. Lugar de realización del estudio

Servicios de Neumología e Infectología del Instituto Nacional de Pediatría, Servicio de Pediatría del Hospital General de México.

b. Población de estudio

Pacientes pediátricos de 0 a 8 años edad con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar y pacientes con neumopatía crónica.

c. Tiempo

Septiembre 2011 a Septiembre 2020. Sin embargo para fines de la graduación de la maestría se realizará un corte al año del inicio del estudio.

d. Criterios de inclusión

1. Niños menores de 8 años.
2. Pacientes con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar.
3. Pacientes con neumopatía crónica sin sospecha clínica de tuberculosis pulmonar.

e. Criterios de exclusión

1. Pacientes que no tengan el consentimiento informado para ingresar a la investigación.
2. Pacientes que ya tengan el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y se encuentren en tratamiento.

f. Criterios de eliminación

Paciente en los que se inicie la prueba terapéutica y no se pueda dar el seguimiento a los dos meses para valorar la respuesta (abandono, transferencia a otro hospital).

g. Tamaño de la muestra

Se realizó el cálculo de muestra de acuerdo a la fórmula de Buderer:

Cálculo de muestra basado en la sensibilidad= $(Z_{1-\alpha/2}^2 * S_N * (1 - S_N)) / L^2 * \text{Prevalencia}$

Cálculo de muestra basado en la especificidad= $(Z_{1-\alpha/2}^2 * S_P * (1 - S_P)) / (L^2 * (1 - \text{Prevalencia}))$

Dónde: S_N : sensibilidad anticipada, S_P : especificidad anticipada, $1-\alpha$: nivel de confianza, $Z_{1-\alpha/2}$: desviación estándar normal que corresponde a α , L: precisión absoluta deseada de la sensibilidad o especificidad. (41)

Se calculó el tamaño muestras con precisión de 0.05 y 0.1. (Cuadros 6 y 7)

Cuadro 6. Cálculo de la muestra por sensibilidad

Método	Sensibilidad	L	Prevalencia	$Z_{1-\alpha/2}$	Tamaño muestral
PCR	0.50- 0.81	0.05	0.3	1.96	1280.5-788.2
	0.50- 0.81	0.1	0.3	1.96	320- 197
QuantiFERON-TB Gold	0.47-.0.93	0.05	0.3	1.96	1275.9-333.4
	0.47-.0.93	0.10	0.3	1.96	318.9- 83.3
ELISA	0.26- 0.86	0.05	0.3	1.96	985.4-616.7
	0.26- 0.86	0.10	0.3	1.96	246.3-154.1

Cuadro 7. Cálculo de la muestra por especificidad

Método	Especificidad	L	Prevalencia	$Z_{1-\alpha/2}$	Tamaño muestral
PCR	0.90	0.05	0.3	1.96	197.5
	0.90	0.10	0.3	1.96	49.3
QuantiFERON-TB Gold	0.84	0.05	0.3	1.96	295.0
	0.84	0.10	0.3	1.96	73.7
ELISA	0.98	0.05	0.3	1.96	43.0
	0.98	0.10	0.3	1.96	10.7

Por lo tanto el tamaño de la muestra está entre 320 y 1281 pacientes; hasta Mayo 2013 se reclutaron 26 niños.

h. Definiciones operacionales

1. Sospecha de tuberculosis pulmonar: paciente con al menos dos de los parámetros clínico, radiológico, epidemiológico.
 - a. Clínico, al menos uno de los siguientes signos y/o síntomas (19-21, 25, 43-9):
 - i. Tos mayor de 2- 3 semanas, que no remite y no mejora.
 - ii. Pérdida de peso mayor a 5% o disminución en un percentil en los últimos tres meses, corroborado por cartilla
 - iii. Fatiga: disminución en el juego o las actividades cotidianas desde el inicio de la tos.
 - iv. Fiebre mayor a 38 grados centígrados por 14 días, que no haya mejorado con un esquema antibiótico.
 - v. Presencia de nódulos linfáticos cervicales, axilares.
 - b. Radiológico:
 - i. Fuertemente sospechoso: lesión cavitada o caverna; hiperlúcida, redondeada, de paredes gruesas, de localización apical o dorsal, acompañada de lesiones satélites con calcificaciones, con retracción y fibrosis. Imágenes nodulares confluentes y cavitadas de localización apical y dorsal, y la infiltración intersticial miliar bilateral y difusa.
 - ii. Sospechoso: condensaciones del lóbulo medio y los infiltrados bronco neumónicos acompañados de ensanchamiento mediastinal. (22, 49-51).
 - c. Epidemiológico: cuando se demuestra el contacto con enfermo bacilífero comprobado de manera prolongada y continua y/o prueba de PPD positiva (49-53).

2. Paciente con tuberculosis pulmonar

- a. Tuberculosis pulmonar confirmada: paciente con criterios de sospecha de tuberculosis pulmonar y con el parámetro bacteriológico o anatomopatológico positivos.
 - i. Bacteriológico: con el aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivos Lowenstein-Jensen, o por identificación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) teñidos con Ziehl- Neelsen (1). Para la interpretación de la baciloscopía, se utiliza la siguiente escala:

Negativa: ausencia de BAAR en 100 campos observados
(+): Menos de un BAAR por campo, en 100 campos observados
(++): 1 a 10 BAAR por campo, en 50 campos observados
(+++): Más de 10 BAAR por campo, en 20 campos observados
 - ii. Anatomopatológico: por la identificación de granulomas formados por infiltrados de linfocitos polimorfonucleares, monocitos, células epiteliales y células gigantes, cuya confluencia forma la lesión nodular característica, siempre y cuando, en el seno de esta formación granulomatosa se identifiquen bacilos ácido alcohol resistentes teñidos con Ziehl- Neelsen (1,22).
- b. Tuberculosis pulmonar probable: paciente con los criterios de sospecha de tuberculosis pulmonar, sin criterio bacteriológico o anatomopatológico positivos, pero con prueba terapéutica positiva.
 - i. Prueba terapéutica: pacientes con mejoría clínica, remisión de las lesiones radiológicas y en caso de contar con cultivos positivos, la negativización de los mismos, al concluir la primera etapa del tratamiento antituberculoso; se debe que considerar descartar las infecciones por *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pneumococcus*, *Legionella spp*, *M. leprae*, *Brucella* u otras micobacterias, porquetambién responden a estos antituberculosos(1,49,53).

3. Paciente sin tuberculosis pulmonar

- a. Tuberculosis pulmonar descartada: paciente con los parámetros clínico, radiológico y epidemiológico sugerentes de tuberculosis pulmonar, sin criterio bacteriológico y anatomopatológico positivos, sin respuesta a la prueba terapéutica y habiendo descartado tuberculosis resistente por sensibilidad a fármacos o epidemiología. O que se diagnóstica otra enfermedad en el transcurso del proceso diagnóstico.
- b. Pacientes neumópatas crónicos: pacientes que presentan síntomas respiratorios de manera continua por seis meses o que tuvieron por lo menos 6 episodios recurrentes durante los últimos 12 meses, que ya han sido

estudiados por un médico general o pediatra, antes de referirse al neumólogo pediatra.

Cuadro 8. Operacionalización de las variables

Variable independientes	Escala	Medición
Tuberculosis pulmonar	Nominal	Si/No
Variables dependientes	Escala	Medición
Baciloscopía	Nominal	Positivo: +;++;+++ /Negativo
PPD	Nominal	Positiva/Negativa (Anexo 1)
Cultivo LJ	Nominal	Positivo/negativo
Cultivo MGIT	Nominal	Positivo/negativo
PCR en punto final	Nominal	Positiva/ Negativa
ELISA	Nominal	Positiva: absorbancia > 0.229/Negativa: absorbancia < 0.229
QuantiFERON-TB Gold	Nominal	Positiva: Antígeno menos blanco ≥ 0.35 UI/mL
Respuesta terapéutica	Nominal	Si/No
IFN- γ	Numérica	pg/mL
TNF- α	Numérica	pg/mL
IL- 2	Numérica	pg/mL
IL- 1b	Numérica	pg/mL
IL- 6	Numérica	pg/mL
IL- 8	Numérica	pg/mL
IL- 5	Numérica	pg/mL
IL- 4	Numérica	pg/mL
IL-10	Numérica	pg/mL
Variables modificadora	Escala	Medición
Edad	Numérica	Años
Variable confusora	Escala	Medición
Inmunodeficiencias	Nominal	Si/No

i. Descripción general del estudio

El estudio se realizó en dos grupos de pacientes, uno con sospecha de tuberculosis pulmonar y uno de pacientes neumópatas crónicos en quienes no se sospechaba tuberculosis pulmonar. Los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar son captados de la consulta externa y hospitalización de Neumología e Infectología del INP, así como del servicio de Pediatría del Hospital General de México. Los pacientes con neumopatía crónica son captados de la consulta externa de Neumología del INP.

En ambos grupos se realizó una historia clínica completa (antecedente epidemiológico, antecedente de vacuna de BCG) y una teleradiografía de tórax, que fue evaluada por dos neumólogos pediatras previamente validados.

En los dos grupos se aplicó PPD.

En ayuno se realizó aspirado gástrico y/o esputo inducido (tres muestras en días consecutivos) o lavado bronquioalveolar, para cultivo en medio Lowenstein-Jensen, MGIT-960 y PCR en punto final; técnica aún no publicada ni patentada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). (Anexo 2) (29, 55-9).

Se tomaron 5mL de sangre periférica para ELISA y QuantiFERON- TB Gold; se colocaron 2mL en un tubo rojo para la ELISA; el resto de la muestra se utilizó para realizar el QuantiFERON- TB Gold TB (Anexo 6 y 7) (60-1).

Las otras citocinas se midieron del resto del sobrenadante de las células mononucleares de sangre periférica de los tubos de QTF- TB Gold con perlas por citometría de flujo.

Las muestras fueron transportadas al IndRE, bajo las recomendaciones del Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis (Anexo 2) (55-7).

En los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar se inició tratamiento antifímico, de acuerdo a la Guía Práctica para la Atención de la Tuberculosis en Niños, Niñas y Adolescentes (Anexo 3)(1). Todos los pacientes en quienes se inició tratamiento antifímico fueron evaluados a los dos meses; al terminar la primera fase del tratamiento, donde se valoró clínica y radiológicamente, también se tomó cultivo de esputo, aspirado gástrico o lavado broncoalveolar, en quienes hayan tenido un cultivo positivo para valorar la negativización del mismo (1, 49,55)(Figura 2 y 3).

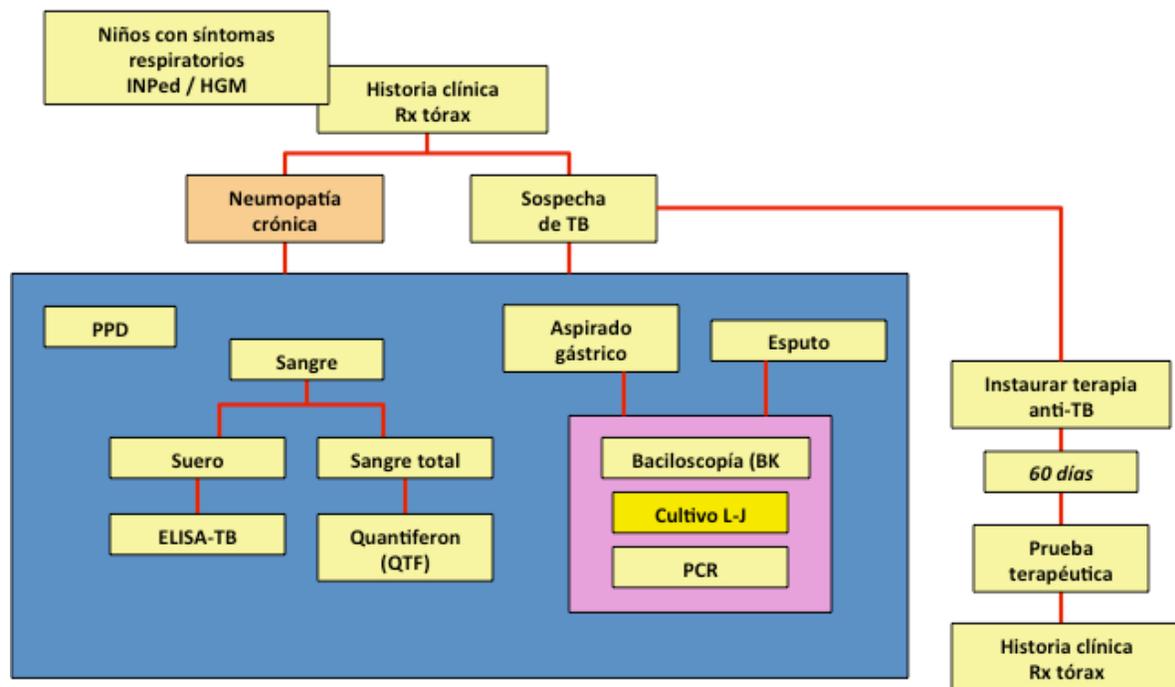


Figura 2. Diagrama de flujo de la estrategia del proyecto

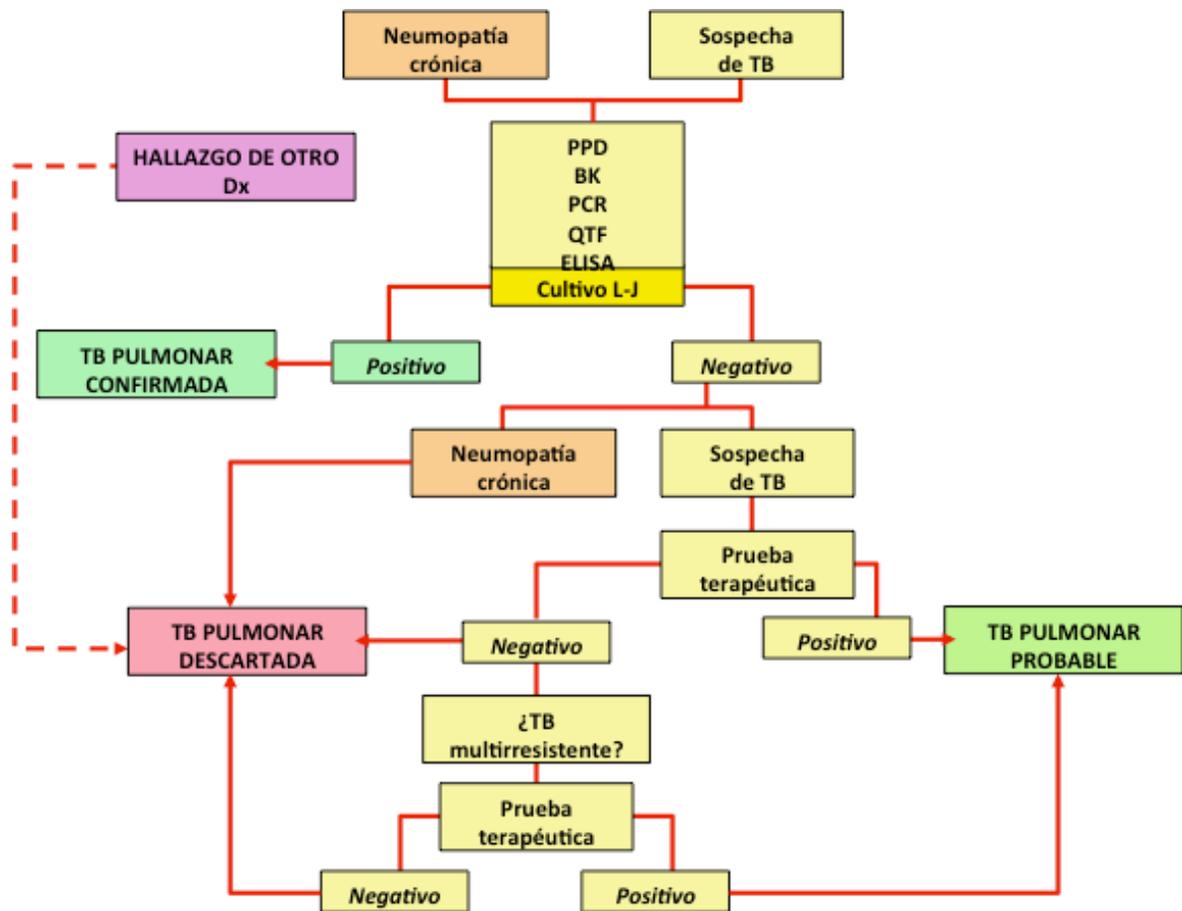


Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia del proyecto

9. Análisis estadístico

Análisis de a prueba diagnóstica: Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, probabilidad de verosimilitud positivos, probabilidad de verosimilitud negativa.

Análisis descriptivo: se analizaron las variables demográficas y clínicas.

10. Aspectos éticos

Riesgo de la investigación: menor al mínimo

Contribuciones o beneficios del estudio para los participantes y la sociedad: No hubo beneficios directos para los participantes. El beneficio del estudio para la sociedad es encontrar una herramienta que permita el diagnóstico de tuberculosis con premura y certeza; de esta manera se disminuiría las complicaciones y mortalidad asociadas a la tuberculosis en este grupo de edad.

Riesgos del estudio para los participantes: Los riesgos de realizar este estudio fueron el dolor durante la toma de muestra sanguínea y posibles hematomas en el lugar de la punción.

Balance riesgo/beneficio: Con los riesgos y beneficios ya expuestos, se concluye que el beneficio es mayor que el riesgo.

Características de los participantes: Los participantes del proyecto al ser niños son una población vulnerable, porque aún no tienen la capacidad cognitiva ni emocional para tomar decisiones, por lo que esta carga recae en los padres o tutores. La justificación de realizar este estudio en niños es la necesidad de conocer cómo funcionan estas pruebas en una población inmunológicamente diferente y si permiten llegar al diagnóstico certero con mayor rapidez.

Confidencialidad: La confidencialidad de los participantes se garantizó mediante el resguardo de los datos obtenidos en un archivero, al cual sólo tiene acceso el líder de la investigación. Los resultados de las pruebas diagnósticas se dieron a conocer únicamente a los padres y a los médicos tratantes y al equipo de investigación; se mantendrá el anonimato de los pacientes durante la publicación. Las muestras sanguíneas una vez que se realicen las pruebas fueron desechadas; las muestras de esputo, lavado gástrico o LAB en caso de que fueran positivas se codificaron y guardarán por un lapso de cinco años, de acuerdo con el reglamento del InDRE

Consentimiento informado:

El consentimiento se obtuvo por un miembro de los investigadores (MAAM) cuando se localizó a un participante que cumplía con los criterios de selección; en la consulta externa (una vez que haya concluido la consulta con el médico tratante) u hospitalización (posterior a la visita médica de la mañana). Se entregó la carta del consentimiento a los padres o tutores; en caso de ser necesario se leyó junto con los padres, para luego responder a las dudas y preguntas. Una vez que se hubo obtenido el consentimiento informado, se tomaron las muestras.

Forma de selección de los participantes: Ingresaron al estudio **todos** los pacientes que cumplieron los criterios de selección.

11. Resultados

Se reclutaron 26 niños de Septiembre de 2011 a Abril de 2013, que cumplieron los criterios de ingreso, 6 niños con neumopatía crónica y 20 con sospecha de tuberculosis. De este último grupo, a cuatro se les diagnosticó otra enfermedad durante el abordaje: linfoma no Hodgkin, infección por *Candida*, infección por EBV y una inmunodeficiencia primaria. Solo en dos pacientes se confirmó tuberculosis con cultivo.

Para el análisis estadístico, considerando que los casos de tuberculosis confirmada son sólo dos, se agruparon estos niños con los de tuberculosis probable, formando el grupo de tuberculosis pulmonar (TBP); el resto de los casos corresponden al grupo de tuberculosis descartada/neumopatía crónica (TB descartada/NPC) (Cuadro 9)

Cuadro 9. Frecuencia de diagnóstico de ingreso y diagnóstico final[¶]

Diagnóstico final	Diagnóstico de ingreso		Total
	Neumopatía crónica	Sospecha TB	
TB descartada/ Neumopatía crónica	6	4	10
TB probable	--	14	14
TB confirmada	--	2	2
	6	20	26

¶ TB: Tuberculosis

a. Características demográficas

Los variables demográficas de edad, sexo y procedencia se detallan en el cuadro 10. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Cuadro10. Datos demográficos según diagnóstico final[¶]

Variable	Diagnóstico final		P	
	TBP n =16	TB descartada/ NPC n =10		
Sexo (M/F)	8/8	6/4	0.701*	
Edad (meses)	47.50 (1-96) [†]	43.50 (16-84) [†]	0.623**	
Procedencia	Distrito Federal	7	7	
	Estado de México	3	1	
	Guerrero	4	--	0.313***
	Veracruz	1	1	
	Otros	1	1	

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica; *Prueba de U de Mann-Whitney, ** Prueba de Fisher, *** Prueba de Chi cuadrado; [†]Mediana (mínimo-máximo)

b. Características clínicas

La frecuencia de comorbilidad se describe en el cuadro 11; al comparar los dos grupos no hay diferencia significativa ($p 0.189$).

Cuadro11. Frecuencia de comorbilidad según diagnóstico final[¶]

Comorbilidad	Diagnóstico final	
	TBP n (%)	TB descartada/ NPC n (%)
Ninguna	13 (0.81)	5 (0.50)
Inmunodeficiencia primaria	3 (0.19)	2 (0.2)
Inmunodeficiencia secundaria	--	3 (0.3)

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica

Sólo dos niños del grupo con tuberculosis pulmonar no contaban con la vacuna BCG, por lo que no se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p 0.508$).

En el Cuadro 12 se observan las características clínicas, siendo la tos el síntoma más frecuente sin diferencia significativa entre los grupos.

Cuadro 12. Características clínicas según diagnóstico final[¶]

Signo o síntoma	Diagnóstico final		P*
	TBP n =16	TB descartada/ NPC n =10	
Tos	11 (0.69)	9 (0.90)	0.352
Fiebre	10 (0.62)	7 (0.70)	1.000
Pérdida de peso	8 (0.50)	3 (0.30)	0.428
Fatiga	3 (0.19)	1 (0.10)	1.000
Linfoadenopatía	2 (0.12)	3 (0.30)	0.340

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica, *Prueba exacta de Fisher

c. Características epidemiológicas

Con respecto al antecedente de contacto con tosedor crónico o con un paciente diagnosticado de tuberculosis, en el grupo de TB descartada/NPC tres de diez niños tenían el antecedente, mientras en el grupo de TBP doce de dieciséis, con diferencia significativa entre los grupos ($p 0.048$) (Figura 4).

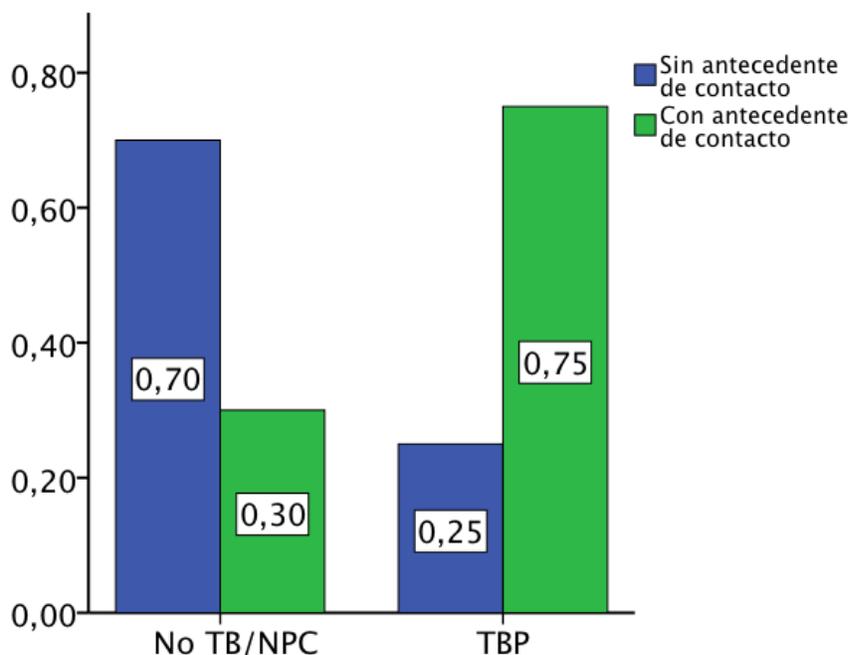


Figura 4. Antecedente de contacto de acuerdo a grupo de diagnóstico final

d. PPD

En cinco niños con TB descartada/ NPC y en uno con TBP no se aplicó la prueba de PPD; por falta de insumos. Fue positiva en un niño de cinco con TB descartada/ NPC y en once de quince del grupo de TB pulmonar; sin diferencia significativa entre los grupos ($p 0.109$) (Figura 5).

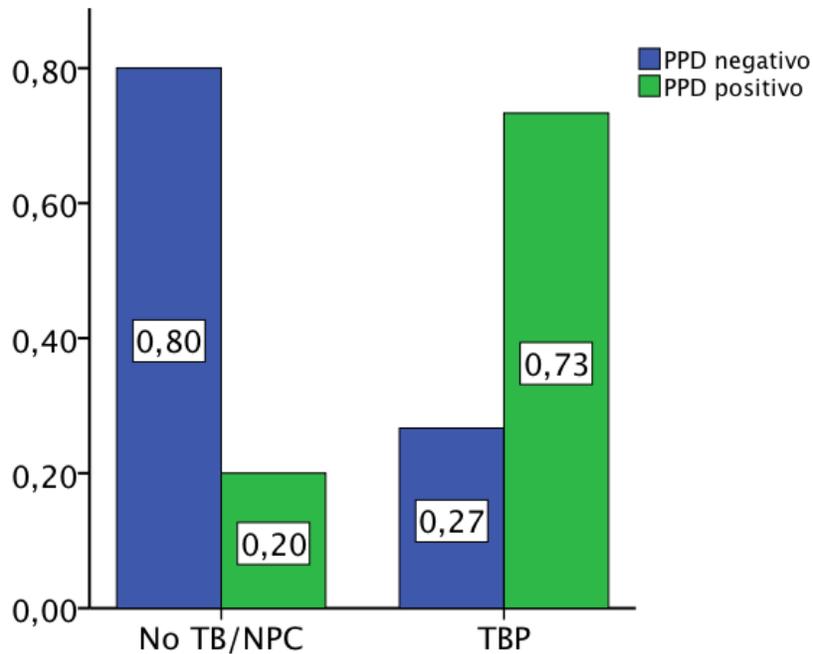


Figura 5. PPD de acuerdo a grupo de diagnóstico final

e. Características radiográficas

Las imágenes radiológicas sugerentes fueron encontradas en cuatro de diez niños con TB descartada/ NPC, mientras en el grupo de TBP en quince de dieciséis, con diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.005$) (Figura 6).

Los patrones radiológicos más frecuentes en los niños del grupo de tuberculosis pulmonar fue el ensanchamiento mediastinal (6/16) y el patrón nodular (6/16) (Cuadro 13).

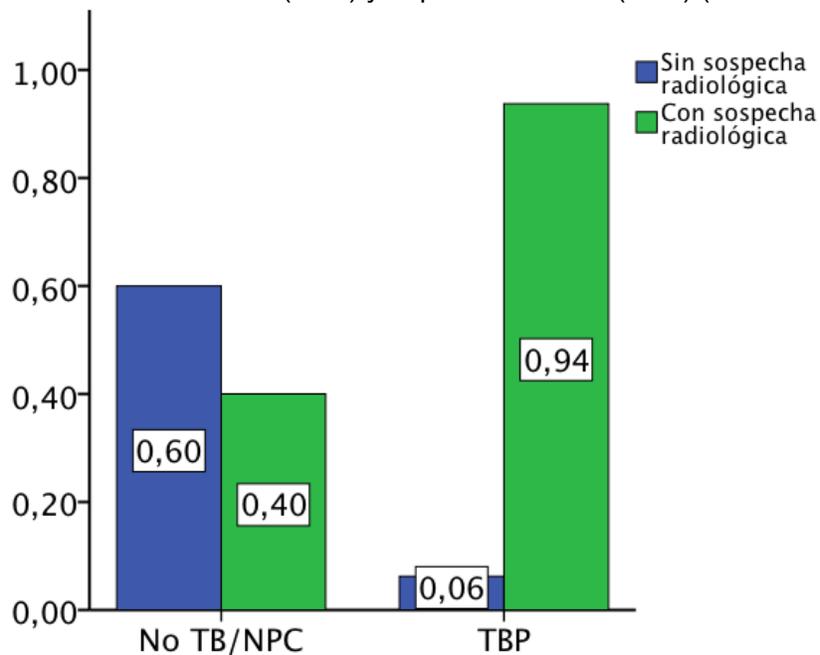


Figura 6. Características radiográficas según diagnóstico final

Cuadro 13. Patrones radiográficos por diagnóstico final[¶]

Patrones radiográficos	Diagnóstico final		P*
	TBP n= 16	TB descartada/ NPC n =10	
Normal	1 (0.06)	2 (0.20)	0.538
Cavitación	1 (0.06)	--	1.000
Patrón nodular	6 (0.37)	1 (0.10)	0.190
Consolidación	1 (0.06)	--	1.000
Derrame pleural	--	2 (0.20)	0.138
Sobredistención	1 (0.06)	1 (0.10)	1.000
Ensanchamiento mediastinal	6 (0.37)	2 (0.20)	0.420
Patrón reticulonodular	--	1 (0.10)	0.385
Patrón reticular	--	1 (0.10)	0.385

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica, TBP: Tuberculosis pulmonar, TB descartada/NPC: Tuberculosis descartada/Neumopatía crónica, *Prueba exacta de Fisher

f. Cultivo y baciloscopías

Se tomó muestra de aspirado gástrico a 21 niños y de esputo inducido a 5 niños. Sólo dos niños con TBP tuvieron el cultivo positivo (0.07). Un cultivo positivo correspondía a una niña de ocho años que radiológicamente tenía una lesión cavitada, por pruebas bioquímicas se identificó *Complejo tuberculosis*; el otro cultivo correspondía a un niño de 1 año 2 meses que radiológicamente presentaba ensanchamiento mediastinal, no se pudo identificar por las pruebas bioquímicas el tipo de micobacteria; se determinó *Complejo tuberculosis* por PCR en punto final.

Dos casos tuvieron baciloscopías positivas (0.07). Una baciloscopía con 1 a 10 bacilos por campo por 50 campos revisados, corresponde a la misma niña con cultivo positivo y la lesión cavitada. La otra baciloscopía con 1 a 9 bacilos por 100 campos revisados, corresponde a una niña de 3 años con un patrón radiológico de ensanchamiento mediastinal y cultivo negativo.

g. PCR de punto final

La PCR de punto final se procesó en las muestras de aspirado gástrico o esputo inducido. Sólo dos niñas tuvieron la prueba positiva; las dos tenían ocho años, una con un patrón radiológico de sobredistensión y la otra con una lesión cavitada.

La parámetros de utilidad diagnóstica del PCR en punto final considerando el cultivo LJ o la prueba terapéutica como pruebas de referencia se detallan en el cuadro 14.

Cuadro 14. Parámetros de utilidad diagnóstica de PCR en punto final[¶]

Parámetros	PCR de punto final		
	Fórmula	Valor	IC
Sensibilidad	2/16	0.12	0.02- 0.39
Especificidad	10/10	1.00	0.65- 1.00
Valor predictivo positivo	2/2	1.00	0.19- 1.00
Valor predictivo negativo	10/24	0.41	0.22- 0.63
Cociente de probabilidad positivo	$0.12/(1 - 1)$	---	---
Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.12) /1$	0.88	0.73- 1.05

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica, IC: Intervalos de confianza

h. ELISA

Los valores del ELISA para *M. tuberculosis* no tuvieron una distribución normal, por lo tanto en el cuadro 15 se describe la mediana, el valor máximo y mínimo según el grupo de diagnóstico final. Cuando se compara la distribución del valor del ELISA entre los grupos de diagnóstico hay diferencia significativa.

Cuadro 15. Valores del ELISA para *M. tuberculosis* por grupo de diagnóstico final[¶]

Diagnóstico final	ELISA para <i>M. tuberculosis</i> (Absorbancia)				P*
	Mediana	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilks	
TB descartada/ NPC	0.117	0.070	0.460	0.000	0.007
TBP	0.187	0.110	0.760	0.001	

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica,* Prueba de U de Mann-Whitney

Los parámetros de utilidad diagnóstica utilizando el punto de corte de 0.229, validado en pacientes adultos, se muestran en el cuadro 16.

Cuadro 16. Parámetros de utilidad diagnóstica de ELISA para *M. tuberculosis*[¶]

Parámetros	ELISA para <i>M. tuberculosis</i>		
	Fórmula	Valor	Intervalo de Confianza 95%
Sensibilidad	6/16	0.37	0.16- 0.64
Especificidad	8/10	0.80	0.44- 0.96
Valor predictivo positivo	6/8	0.75	0.35- 0.95
Valor predictivo negativo	8/18	0.44	0.22- 0.68
Cociente de probabilidad positivo	$0.37/(1 - 0.80)$	1.88	0.47- 7.54
Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.37) /0.80$	0.78	0.48- 1.28

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica

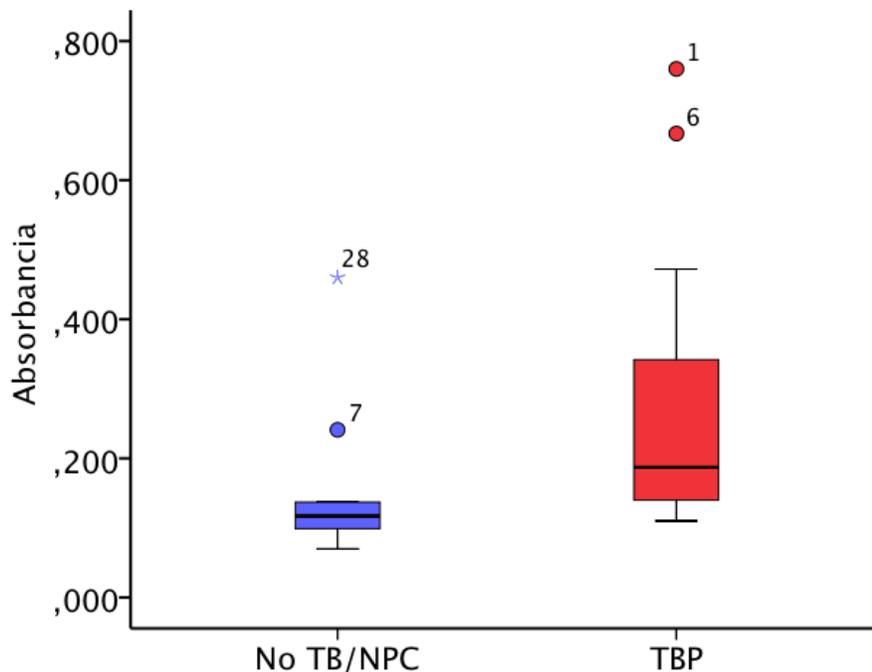


Figura 7. Diagrama de caja del valor del ELISA para *M. tuberculosis* por grupo de diagnóstico final

Se realizó una curva ROC con los valores de absorbancia del ELISA para *M. tuberculosis*, para determinar un nuevo punto de corte. Según las coordenadas de la curva ROC, si se considera una prueba positiva mayor de 0.141, la sensibilidad es de 0.75 y la especificidad de 0.80; con un área bajo de la curva de 0.81 y con una significancia de 0.008 (Cuadro 17 y Figura 8).

Se realizó un análisis comparando la distribución del ELISA para *M. tuberculosis* si había diferencias entre el grupo de vacunados con BCG y los que no, sin encontrar diferencia significativa (p 0.345)

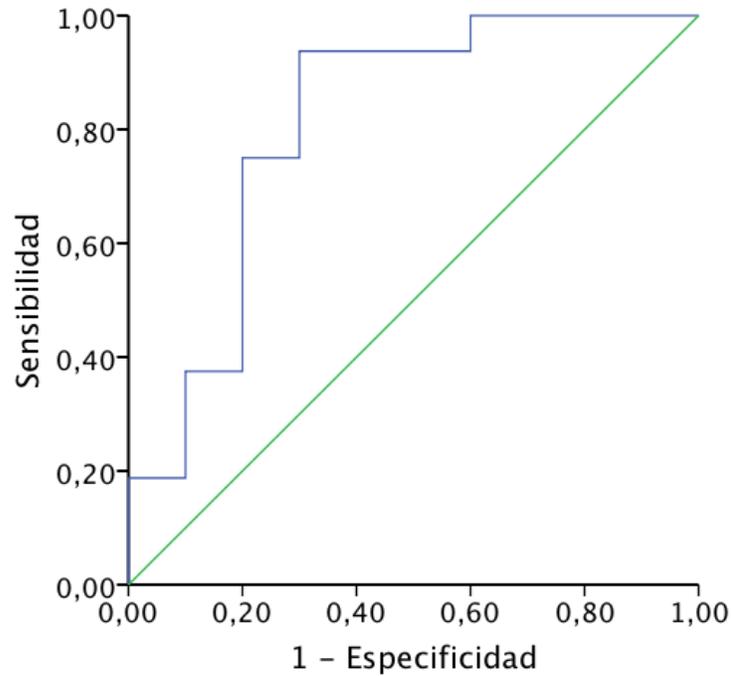


Figura 8. Curva ROC del ELISA para *M. tuberculosis*

Cuadro 17. Coordenadas de la curva ROC del ELISA para *M. tuberculosis*

Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	1 - Especificidad
0.000	1.000	1.000
0.077	1.000	0.900
0.091	1.000	0.800
0.103	1.000	0.700
0.108	1.000	0.600
0.111	0.938	0.600
0.117	0.938	0.500
0.121	0.938	0.400
0.126	0.938	0.300
0.131	0.875	0.300
0.133	0.813	0.300
0.136	0.750	0.300
0.141	0.750	0.200
0.146	0.688	0.200
0.152	0.625	0.200
0.168	0.563	0.200
0.187	0.500	0.200
0.202	0.438	0.200
0.225	0.375	0.200
0.249	0.375	0.100
0.261	0.313	0.100
0.342	0.250	0.100
0.439	0.188	0.100

0.466	0.188	0.000
0.569	0.125	0.000
0.713	0.063	0.000
1.000	0.000	0.000

Se calcularon los parámetros de utilidad diagnóstica, con el punto de corte de 0.146, que se detallan en el cuadro 18.

Cuadro 18. Parámetros de utilidad diagnóstica de ELISA para *M. tuberculosis* con punto de corte modificado[¶]

Parámetros	ELISA para <i>M. tuberculosis</i>		
	Fórmula	Valor	Intervalo de Confianza 95%
Sensibilidad	11/16	0.68	0.41- 0.87
Especificidad	8/10	0.80	0.44- 0.96
Valor predictivo positivo	11/13	0.84	0.53- 0.97
Valor predictivo negativo	8/13	0.61	0.32- 0.84
Cociente de probabilidad positivo	$0.68/(1 - 0.80)$	3.44	0.95- 12.40
Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.68) / 0.80$	0.39	0.18- 0.86

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica

g. QuantiFERON-TB Gold

La prueba de QTF- TB Gold se realizó a 21 niños de los 26, por falta de reactivos. De los cinco casos que no cuentan con esta prueba, cuatro corresponden al grupo de TBP y uno al grupo TB descartada/NPC. Dada la distribución anormal de la diferencia entre el antígeno y el blanco, se describen la mediana, el valor mínimo y máximo en el cuadro 19. Al comparar la distribución de este valor entre los grupos de diagnóstico, hay diferencia significativa (Figura 9).

Cuadro 19. Valores del QTF- TB Gold por grupo de diagnóstico final: prueba de referencia cultivo y/o prueba terapéutica

Diagnóstico final	QTF- TB Gold (Antígeno- Blanco) UI/mL				P*
	Mediana	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilks	
TB descartada/ NPC	0.00	-0.11	0.43	0.000	0.022
TBP	0.04	0.00	7.95	0.000	

¶: Prueba de referencia: cultivo o prueba de terapéutica, TBP: Tuberculosis pulmonar, TB descartada/NPC: Tuberculosis descartada/Neumopatía crónica, DO: Densidad óptica, * Prueba de U de Mann- Whitney

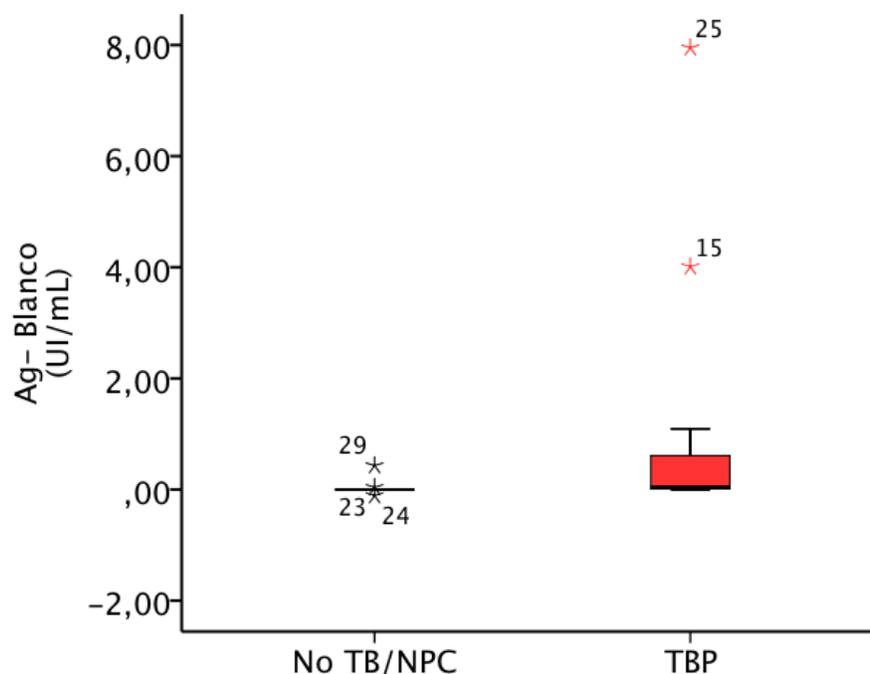


Figura 9. Diagrama de caja de valores de QTF- TB Gold (Antígeno- Blanco) por grupo de diagnóstico final

Los casos 15 y 25 son valores extremos, que corresponden a dos niños con Tuberculosis pulmonar, al excluirlos del análisis y comparar nuevamente la distribución entre los grupos por diagnóstico final, la diferencia aún es significativa ($p 0.004$).

Los parámetros de utilidad diagnóstica del QTF- TB Gold considerando el punto de corte que propone la marca (0.35UI/mL) y el cultivo LJ o prueba terapéutica como pruebas de referencia se detallan en el cuadro 20.

Cuadro 20. Parámetros de utilidad diagnóstica de QTF- TB Gold usando el punto de corte propuesto por el productor del kit (0.35 UL/mL)

Parámetros	QTF- TB GOLD		
	Fórmula	Valor	Intervalo de Confianza al 95%
Sensibilidad	5/12	0.42	0.16- 0.71
Especificidad	7/9	0.79	0.40- 0.96
Valor predictivo positivo	5/7	0.71	0.30- 0.95
Valor predictivo negativo	7/14	0.50	0.24- 0.76
Cociente de probabilidad positivo	$0.42(1 - 0.78)$	1.88	0.47- 7.56
Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.42) / 0.78$	0.75	0.41- 1.36

Se realizó una curva ROC con los valores de QTF- TB Gold, para obtener un nuevo punto de corte. Según las coordenadas de la curva ROC, si se considera una prueba positiva mayor de 0.005, la sensibilidad es de 0.83 y la especificidad de 0.78; con un área bajo de la curva de 0.80y con una significancia de 0.019 (Figura10).

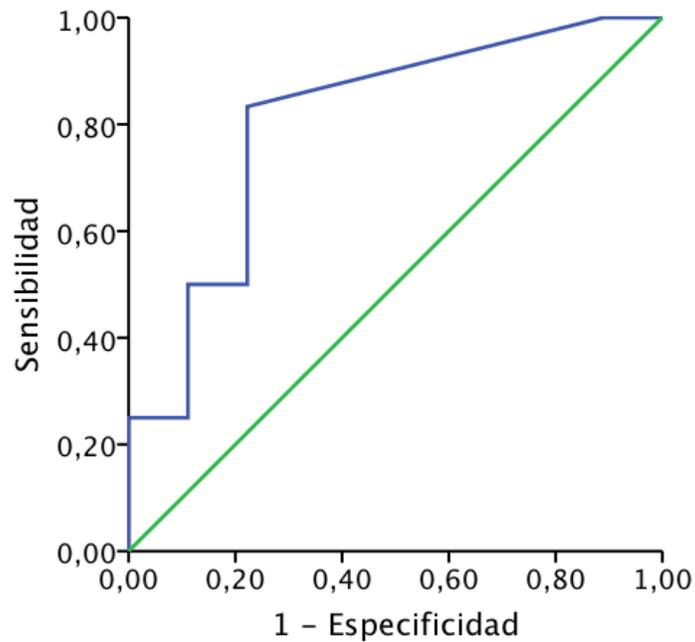


Figura 10. Curva ROC para QTF- TB Gold

Cuadro 21. Coordenadas de la curva ROC para QTF- TB Gold

Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1.110	1.000	1.000
-0.055	1.000	0.889
0.005	0.833	0.222
0.020	0.667	0.222
0.035	0.500	0.222
0.045	0.500	0.111
0.090	0.333	0.111
0.280	0.250	0.111
0.760	0.250	0.000
2.550	0.167	0.000
5.980	0.083	0.000
8.950	0.000	0.000

Se calcularon nuevos parámetros de utilidad diagnóstica con el punto de corte de 0.005UI/mL, estos se encuentran en el cuadro 22.

Cuadro 22. Parámetros de utilidad diagnóstica de QTF- TB Gold modificando el punto de corte (0.005 UI/mL)

Parámetros	QTF- TB GOLD		
	Fórmula	Valor	Intervalo de Confianza al 95%
Sensibilidad	10/12	0.83	0.50- 0.97
Especificidad	7/9	0.77	0.40- 0.96
Valor predictivo positivo	10/12	0.83	0.50- 0.97
Valor predictivo negativo	7/9	0.77	0.40- 0.96
Cociente de probabilidad positivo	$0.83/(1 - 0.77)$	3.75	1.08- 13.07
Cociente de probabilidad negativo	$(1 - 0.83) / 0.77$	0.06	0.02- 0.80

h. Citocinas Th1 y Th2

En el cuadro 23 se muestran los valores de la diferencia entre el antígeno y el blanco de las citocinas Th1 y Th2 probadas en este estudio. Se comparó la distribución de esta diferencia entre los grupos de diagnóstico, encontrando diferencia significativa en IFN- γ y tendencia a la significancia en IL-10 (Figura 11).

Se comparó la distribución de todas las citocinas, en relación a sospecha clínica y antecedente de contacto, no se encontró diferencia significativa. Al comparar la distribución de las citocinas en relación con sospecha radiológica se encontró tendencia a la significancia en IFN- γ (p 0.056) y TNF- α (p 0.079).

Cuadro 23. Valores de citocinas por grupo de diagnóstico final: prueba de referencia cultivo o prueba terapéutica

Citocinas	Diagnóstico final	Mediana	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilks	P*
IFN γ (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	0.00	-12.06	2.19	0.001	0.003
	TBP	2.04	-0.19	397.56	0.000	
IL-2 (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	0.00	-2.15	233.74	0.000	0.651
	TBP	1.43	-2.08	162.31	0.000	
TNF- α (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	0.00	-207.15	59.31	0.002	0.862
	TBP	0.54	-53.19	212.73	0.000	
IL- 1b (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	13.19	-1197.46	270.60	0.001	0.508
	TBP	24.44	-183.99	1577.11	0.000	
IL-8 (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	765.88	-3471.11	10786.87	0.068	0.277
	TBP	2846.84	-575.68	11605.05	0.110	
IL- 6 (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	41.06	-1305.38	7408.56	0.005	0.219
	TBP	1208.15	-172.30	6102.02	0.066	
IL-5 (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	0.06	-0.44	2710.83	0.000	1.000
	TBP	0.51	-0.40	81.32	0.000	
IL-4 (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	0.00	-0.54	0.00	0.000	0.808
	TBP	0.00	-2.09	5.62	0.001	
IL-10 (Antígeno-Blanco) pg/mL	TB descartada/ NPC	-0.24	-21.09	6.89	0.003	0.069
	TBP	0.91	-0.31	8.70	0.013	

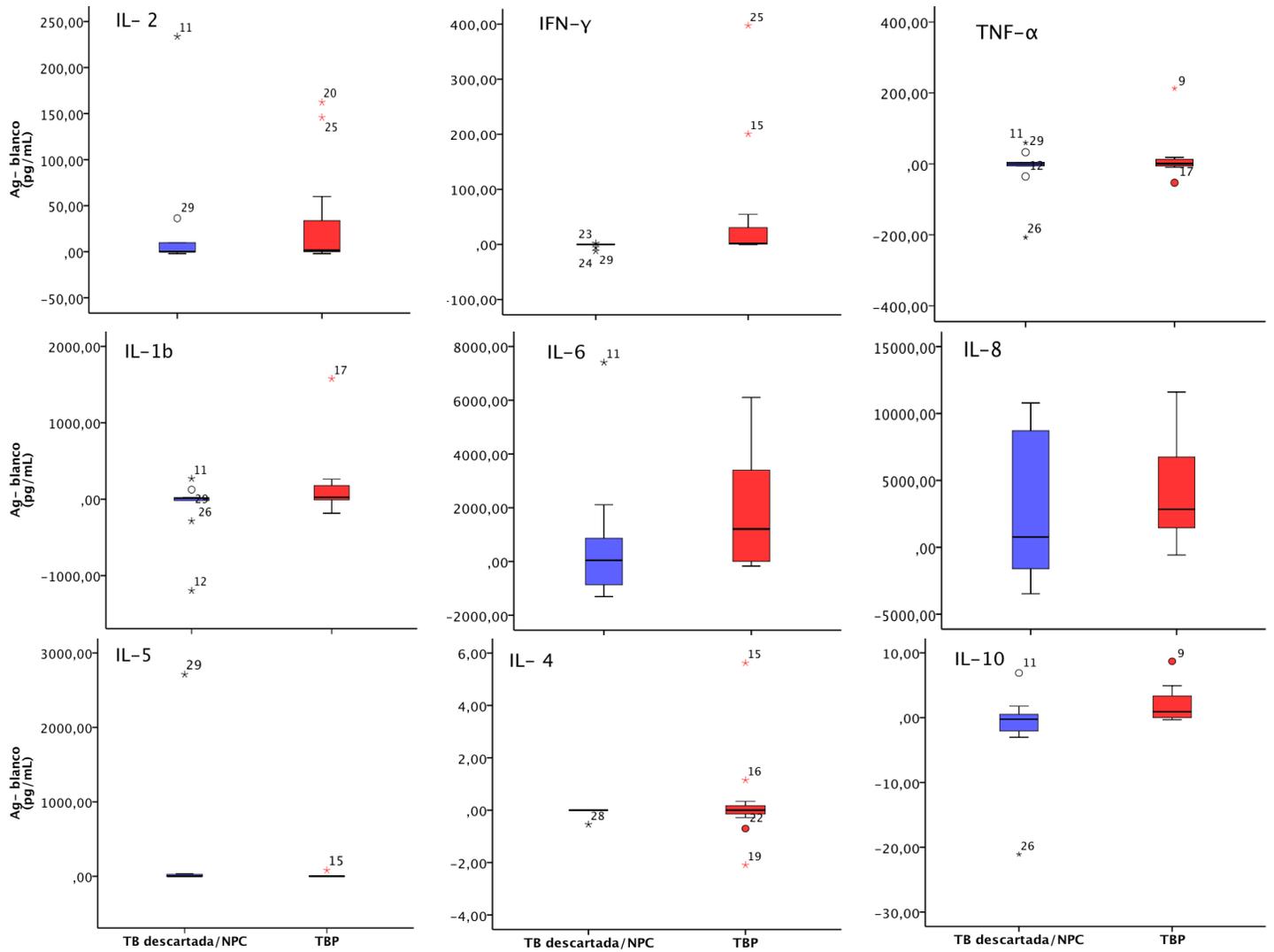


Figura 11. Diagramas de caja correspondiente a los valores de respuesta específica (Antígeno-Blanco) de citocinas Th1 y Th2 por grupo de diagnóstico final

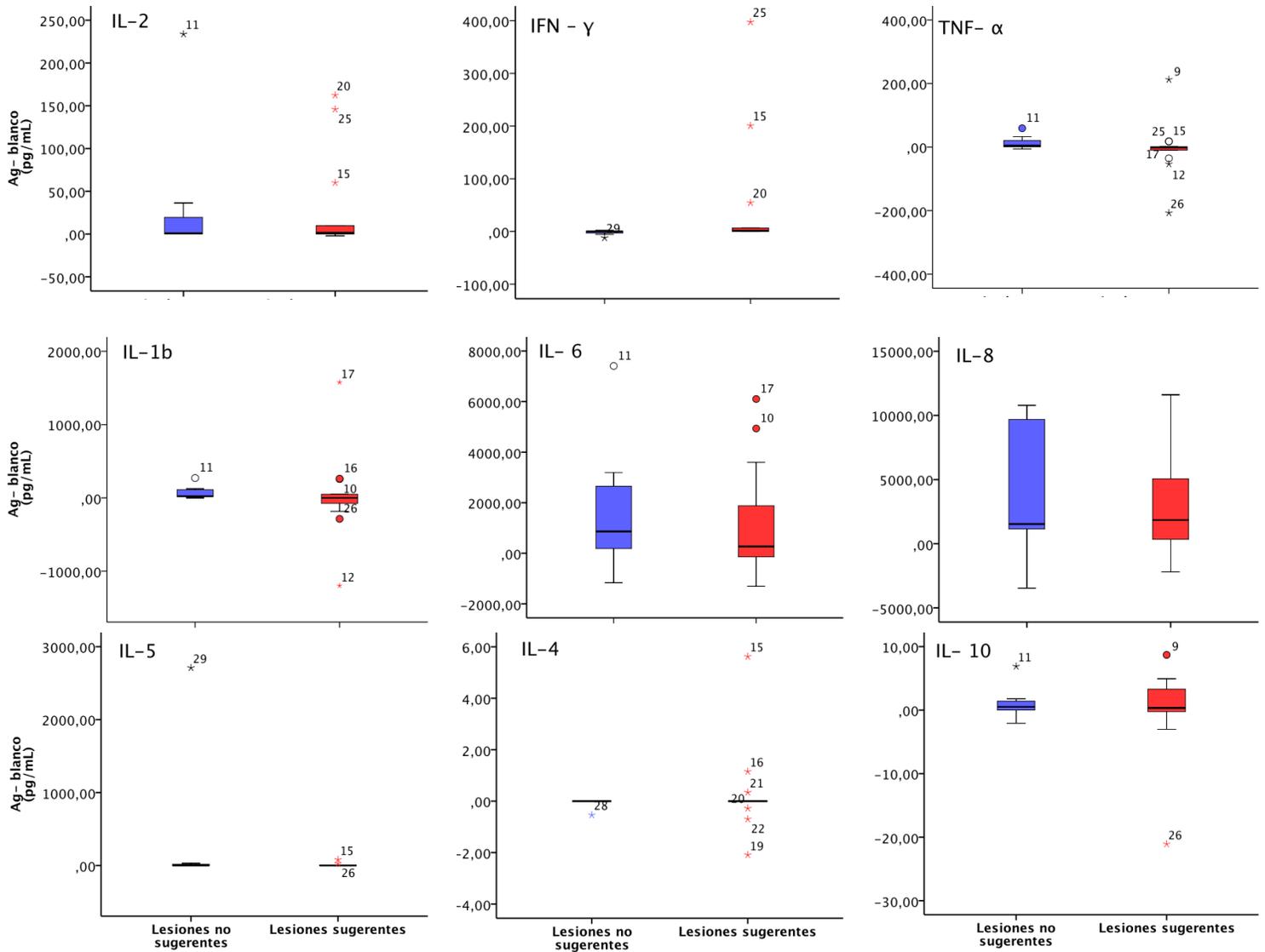


Figura 12. Diagramas de caja correspondiente a los valores de respuesta específica (Antígeno-Blanco) de citocinas Th1 y Th2 de acuerdo a sospecha radiológica

Al analizar sólo los casos de Tuberculosis pulmonar, se encontró diferencia significativa en la distribución de TNF- α en relación a la tos ($p 0.048$), IL-10 en relación a la pérdida de peso ($p 0.015$) y tendencia a la significancia en la distribución de TNF- α con relación a la fiebre ($p 0.073$)

Al comparar la distribución entre las citocinas en relación a gravedad, se encontró diferencia significativa en IL-2 ($p 0.012$) e IL-8 ($p 0.006$) y tendencia a la significancia en TNF- α ($p 0.069$) y IL-6 ($p 0.058$).

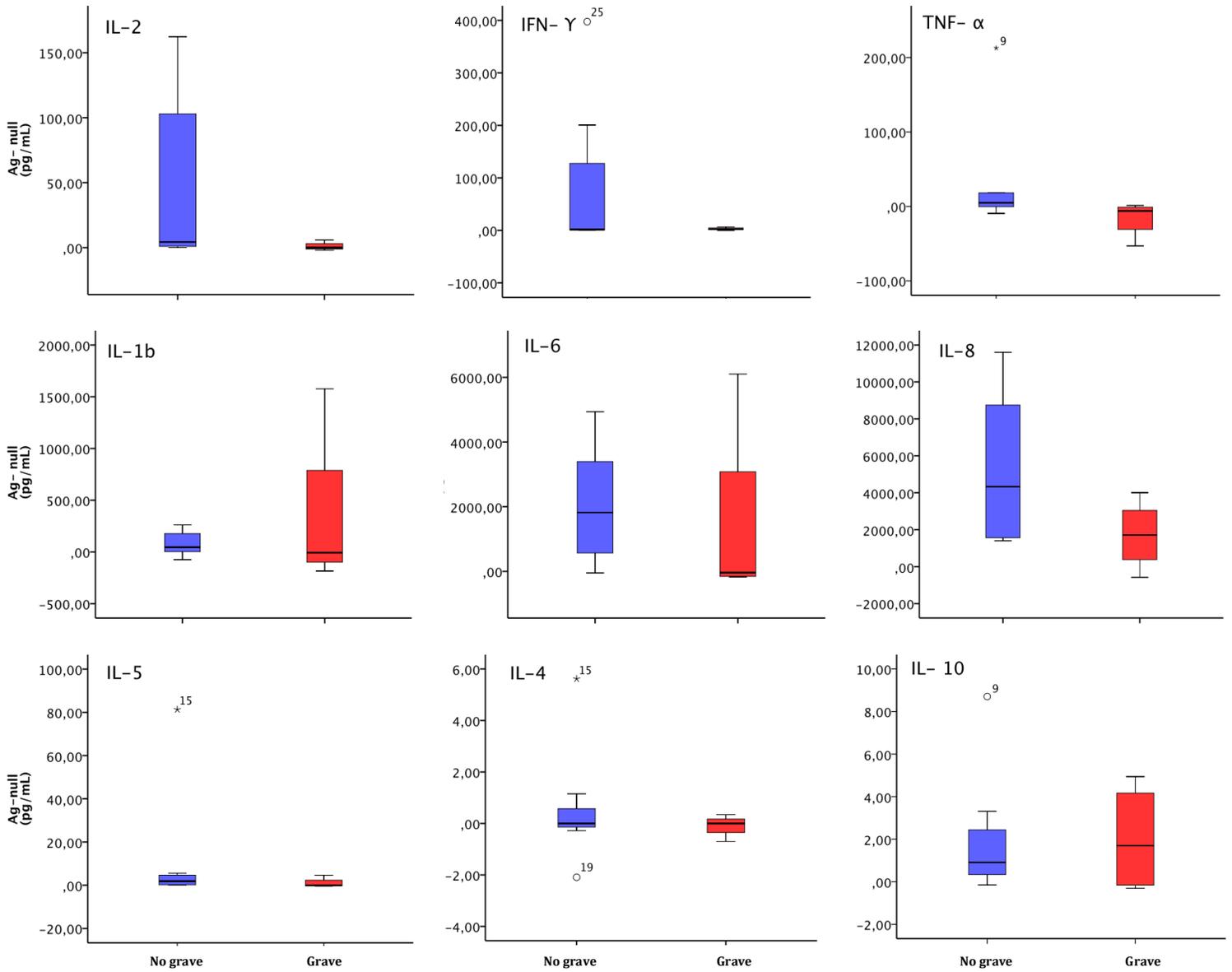


Figura 13. Diagramas de caja correspondiente a los valores de respuesta específica (Antígeno-Blanco) de citocinas Th1 y Th2 en relación con gravedad

i. Utilidad diagnóstica de las pruebas probadas

En el cuadro 24, se comparan los parámetros de utilidad diagnóstica de las pruebas que estudiaron solas y combinadas entre ellas. Como puede observarse el ELISA tuvo los parámetros más altos utilidad mientras que la PCR fue la prueba con menores valores. El QTF- Tb Gold con punto de corte modificado tiene mejores valores, incluso que el ELISA. Y al combinarlas , las pruebas inmunológicas son las que mayor utilidad tienen.

Cuadro 24. Tabla comparativa de parámetros de utilidad diagnóstica

	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo	Cociente de probabilidad positivo	Cociente de probabilidad negativo
ELISA	0.68	0.80	0.84	0.61	3.44	0.39
PCR	0.12	1.00	1.00	0.41	--	0.88
QTF- TB Gold	0.42	0.77	0.71	0.50	1.88	0.75
ELISA o PCR	0.69	0.80	0.85	0.61	3.44	0.39
ELISA o QTF- TB Gold	0.83	0.78	0.83	0.78	3.75	0.21
QTF- TB Gold o PCR	0.58	0.89	0.87	0.61	5.25	0.47
QTF- TB Gold o PCR o ELISA	0.83	0.78	0.83	0.78	3.75	0.21
QTF- TB Gold modificado	0.83	0.77	0.83	0.77	3.75	0.06
ELISA o QTF- TB Gold modificado	0.92	0.77	0.85	0.87	4.13	0.11
QTF- TB Gold modificado o PCR	0.83	0.89	0.91	0.80	7.50	0.19
QTF- TB Gold modificado PCR o ELISA	0.92	0.78	0.85	0.88	4.13	0.11
PPD	0.73	0.80	0.92	0.50	3.67	0.33
Rayos X	0.93	0.60	0.79	0.86	2.34	0.10

12. Discusión

Ante la falta de una prueba que ayude al diagnóstico rápido y certero de tuberculosis en el niño, el objetivo de este estudio fue determinar la utilidad del ELISA, la PCR en punto final y el QTF- TB Gold, además de medir citocinas de las respuestas Th1 y Th2 en el niño con sospecha.

Si bien hay varias maneras de realizar el cálculo del tamaño muestral, se decidió emplear la fórmula de Burdener por ser la que más se ajusta a la pregunta de investigación y la que considera el error en la estimación de los intervalos de confianza de la sensibilidad y especificidad. Teniendo en cuenta el número de casos por año con diagnóstico de tuberculosis que llegan al INP, se calculó completar la muestra en 10 años, situación por la que se realizaron las siguientes acciones: el Hospital General de México se incorporó al estudio con el fin de incluir un mayor número de casos. Se procedió a incluir otros hospitales del interior de la República; pero debido a que la realización de las pruebas en diversos laboratorios podría incrementar el grado de error del estudio, se descartó esta posibilidad.

Dado que el reclutamiento de los pacientes va a tomar un tiempo de 5 a 10 años para completar el tamaño de la muestra calculada, se decidió realizar un corte al año con el propósito de realizar una evaluación de los resultados, determinar su eficacia en el diagnóstico de la tuberculosis en el niño y los factores que podrían modificarse, desde la toma de la muestra, el transporte y la ejecución de las pruebas.

A pesar de que el tamaño de la muestra es parcial y el estudio aún se está realizando, estos resultados pueden orientar y ser una guía para la realización del resto del estudio y de otros protocolos bajo esta línea de investigación. Por tanto, se procedió a realizar el análisis correspondiente, pese a que aún no tienen aplicabilidad clínica.

La prueba de PPD es una prueba inmunológica de diagnóstico inicial que puede cruzar con la vacuna de BCG en la mitad de los niños vacunados, pero el porcentaje de individuos con esta prueba positiva va disminuyendo en los dos a tres años de edad (18). Sin embargo, no encontramos variación significativa con la edad (menor de 36 meses) ni con antecedente de vacunación; además el PPD tiene un valor de sensibilidad mayor al de las otras pruebas evaluadas, por lo que es prueba útil, barata y que orienta al diagnóstico y a inicio temprano de tratamiento. Sin embargo, no hay que dejar de mencionar que su interpretación tiene cierto grado de subjetividad, por lo que la capacitación en su aplicación e interpretación es de vital importancia.

El ELISA que se validó en pacientes adultos, dando una sensibilidad de 0.80 y una especificidad de 0.94 (60), no se había probado en pacientes pediátricos, pero sí otros inmunoensayos con parámetros diagnósticos variables (36-38). Se debe considerar que entre un estudio y otro difiere la edad de los niños incluidos, tipo de antígeno utilizado, el antecedente de BCG e incluso los controles. En el presente estudio se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad adecuados para apoyar el diagnóstico, especialmente porque todos menos un niño, estaban vacunados con BCG, y los reportes previos indican reacción cruzada con esta vacuna (36-38). También cabe resaltar que esta prueba no se relacionó negativamente con la inmunodeficiencia primaria o secundaria. Esto es relevante, dado que en varios estudios se había reportado la no utilidad del ELISA, porque los antígenos utilizados cruzan con otras micobacterias, incluyendo la BCG (18, 36).

La utilidad diagnóstica de QFT-TB Gold fue similar a la reportada en la literatura para la edad pediátrica, con una sensibilidad baja y una especificidad alta (36, 40); sin embargo, se observa que hay diferencia significativa en la distribución de la respuesta específica entre los grupos de acuerdo al diagnóstico final, sugiriendo que hay producción de interferón gamma en respuesta a los antígenos específicos de *M. tuberculosis*, pero que no alcanzan el punto de corte señalado por la marca del estuche comercial. Esta respuesta a los antígenos, aunque es positiva, puede no ser comparable con la de los pacientes adultos ya que el sistema inmunológico de los niños está en desarrollo; aunque en niños con TB latente se han reportado valores más altos de interferón gamma, que lo se encontró hasta el momento, tampoco llegan al punto de corte que propone la casa comercial que fabrica el producto.

Se sabe que el progreso de la infección está limitado por la inducción de la respuesta celular mediada por IFN-gamma, y esta respuesta es menos fuerte en niños menores de 8 años que en adultos, como ya se describió en el estudio de Rose et al (62). Por lo anterior, y a pesar del tamaño de la muestra se decidió analizar estos valores mediante una curva ROC, que mostró que en los niños con sospecha clínica de TBP, tan sólo la presencia de IFN-gamma en respuesta a los antígenos de *M. tuberculosis* podría tener

valor diagnóstico, pues se aumenta la sensibilidad de manera considerable, sin modificar la especificidad.

En relación a las otras citocinas, todavía no tenemos datos que permitan sugerir su valor diagnóstico, con la posible excepción de la IL- 10. Esta citocina tiene un papel de regulación, sugiriendo que una producción incrementada estaría favoreciendo el desarrollo de la enfermedad, pero es importante mencionar que no hubo relación entre los niveles de IL-10 y de IFN- γ .

También Kumar et al. informan que la respuesta de Th1 esta disminuida en niños con TB activa, por lo tanto la producción de IFN- γ y TNF- α está disminuida, además informan que la producción de IL- 10 no está alterada; lo que contrasta con lo reportado por otros estudios que informan valores bajos de IL-10 y altos de IL-2(9,10, 63). Gourguillon et al proponen un punto de corte de la relación TNF- α /IL- 2 como diagnóstico de TB activa, pero hasta el momento en el presente estudio no se pudo constatar (10).

IL- 10, IFN- γ y TNF- α se relacionaron con la presencia de algunos signos como tos, fiebre o pérdida de peso. Ya se había descrito que tanto el IFN- γ como el TNF- α se relacionan con síntomas, pero no IL- 10 (8,9). Esto podría modificarse al aumentar el número de casos. Se dividió el grupo de TBP por gravedad, encontrando una relación inversa con los niveles de IL- 2, TNF- α , IL- 1b e IL- 8; sugiriendo que la respuesta inmunológica en los niños con mayor compromiso es menor, y por ende con la gravedad de la enfermedad.

Se esperaba que la PCR en punto final tuviera mayor sensibilidad, por tener capacidad de identificar una menor cantidad de bacilos que el cultivo o labaciloscopía; sin embargo con tan sólo dos PCR positivos, con valores de utilidad diagnóstica menores a los reportados en otros estudios, se sugiere que no es útil(28-31). Los resultados positivos de cultivo LJ, baciloscopías y PCR en punto final están en relación con la condición paucibacilar de los pacientes pediátricos con tuberculosis primaria, así como con el tipo de muestra; que en los niños pequeños generalmente es aspirado gástrico, donde el bacilo es más lábil. Existen otras opciones actualmente como el Xpert/MTB/RIF, que es un PCR en tiempo real que tendría mayor sensibilidad; en otros estudios en pacientes pediátricos la utilidad diagnóstica es similar a la que se informa para el PCR en punto final (33-35, 64). Por lo tanto, aunque se realice una técnica tan prometedora en esputo o aspirado gástrico en el niño probablemente no se obtendrán los resultados esperados, sugiriendo que esta prueba molecular no es aplicable a este grupo de edad.

Las imágenes radiológicas sugerentes tienen un alto valor diagnóstico, como ya se reportó en otros estudios, siendo el ensanchamiento mediastinal -que traduce adenopatía- el hallazgo más frecuente (6). Las imágenes están en relación con las características inmunológicas y clínicas del niño con tuberculosis primaria que refleja el compromiso linfohematógeno. Sin embargo, en este estudio la interpretación de las radiografías fue realizada por expertos, por lo que su alto valor diagnóstico podría reducirse cuando se aplique a población que es atendida en primer o segundo nivel. También hay que tomar en cuenta los antecedentes epidemiológicos: en un niño con un cuadro clínico de sospecha de tuberculosis buscar el antecedente de contacto con paciente tosedor crónico es primordial; la frase: “detrás de un niño con tuberculosis hay un adulto enfermo” quedó sustentada en el presente estudio, ya que el 0.8 de los niños TBP tenían este antecedente. No obstante, los médicos deben estar sensibilizados ante la sospecha de la enfermedad, para que de esta manera se interrogue el antecedente de manera intencionada.

Aunque el tamaño de la muestra fue pequeño, se realizó el ejercicio de combinar las pruebas para mejorar los parámetros de utilidad diagnóstica. Comparando las tres pruebas que se estudiaron, el ELISA sería el que tiene mayor utilidad. En el caso de que el niño tuviera una prueba inmunológica positiva (ELISA o QTF- TB Gold) la probabilidad de que tenga tuberculosis es mayor. Si consideramos al QTF- TB Gold con el punto de

corte modificado, tiene mejores parámetros de utilidad diagnóstica que las otras pruebas; y combinado con el ELISA, la sensibilidad llega a más de 0.9, sin modificar significativamente la especificidad; siendo ésta la mejor combinación. La PCR no modifica estos valores.

Nuevamente hay que tomar en cuenta que los niños que se incluyeron en el estudio son de una población diferente a la que el médico de primer contacto se va enfrentar, ya que son pacientes de hospitales de referencia, con diagnósticos más complejos y de difícil abordaje.

13. Conclusiones

Dado que la muestra es parcial, las conclusiones tienen carácter preliminar ya que al incrementar el tamaño de la muestra pueden modificarse.

El PPD es una herramienta accesible y barata, que sigue siendo importante en el momento del diagnóstico del niño con tuberculosis pulmonar y que incluso puede llegar a tener valores de utilidad diagnóstica más altos que otras pruebas.

Las pruebas inmunológicas que se evaluaron, el ELISA para *M. tuberculosis* y el QFT-TB Gold, tienen altos valores diagnósticos, siempre que se realice la modificación de su punto de corte. Por lo tanto, en el niño con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar podrían ser herramientas útiles en el momento del diagnóstico aunado a la radiografía y al PPD.

Por otro lado, los parámetros de utilidad de la PCR fueron muy bajos, sugiriendo que esta prueba podría no ser aplicable en niños menores de ocho años.

14. Referencias

1. Programa Nacional de Tuberculosis. Guía Práctica para la Atención de la Tuberculosis en Niños, Niñas y Adolescentes. ISBN 970-721-334-5. Secretaría de Salud de Estados Unidos Mexicanos, 2008.
2. www.who.int/tb/data
3. World Health Organization. Tuberculosis Report 2012. ISBN 978-92-4-156450-2.
4. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
5. <http://cenave.gob.mx/tuberculosis/>
6. Cobos N. Tratado de Neumología infantil. Segunda Edición. Editorial Ergón. España 2009
7. Jones C, Whittaker E, Bamford A, Kampmann B. Immunology and pathogenesis of childhood TB. Paediatric Respiratory Reviews 2011;12:3–8.
8. Basu Roy R, Whittaker E, Kampmann B. Current understanding of the immune response to tuberculosis in children. Curr Opin Infect Dis 2012;25:250-7.
9. Kumar NP, Anuradha R, Suresh R, Ganesh R, Shankar J, Kumaraswami V. Suppressed Type 1, Type 2, and Type 17 Cytokine Responses in Active Tuberculosis in Children. Clin Vaccine Immunol 2011;18:1856-64.

10. Gourgouillon N , Lauzanne A, Cottart CH, Curis E, Debord C, Gurin-El Khourouj V et al. TNF- α /IL -2 ratio discriminates latent from active tuberculosis in immunocompetent children: a pilot study. *Ped Res* 2012;72:370-4.
11. Herzog H. History of Tuberculosis. *Respiration* 1998;65:5–15.
12. Marais BJ, Pai M. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child* 2007;92:446–52.
13. Heather JM. Primary tuberculosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2001;7:133-41.
14. Donald PR, Marais BJ, Barry CF. Age and the epidemiology and pathogenesis of tuberculosis. *Lancet* 2010;375:1853-4.
15. Perez-Velez CM, Marais BJ. Tuberculosis in Children. *N Engl J Med* 2012;367:348-61.
16. Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann B. Paediatric tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2008;8:498–510.
17. Rigouts L. Diagnosis of childhood tuberculosis. *Eur J Pediatr* 2009;168:1285–1290.
18. Lighter J, Rigaud M. Diagnosing Childhood Tuberculosis: Traditional and Innovative Modalities. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2009;39:61-88.
19. Stegen G, Hones K, Kaplan P. Criteria for diagnosis of childhood tuberculosis. *Pediatrics* 1969; 43: 260-65.
20. Toledo GA, Katz A, Montiel VJ, Rico MF. Criterios de diagnóstico en tuberculosis infantil. *Rev Mex Pediatr* 1979;;: 239- 43.
21. Pérez-Fenández LF, Ridaura Sanz C, Gomez CR. Bases para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en el niño. *Bol Med Hosp Infant Méx* 1984;41:155-61.
22. Pérez- Fernández LF, Garcia E, Sosa C, López C, Arcila LE. Utilidad de la técnica de inmunoensayo enzimático ELISA en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en el niño. *Acta Ped Méx* 1994;15:55-63.
23. Marais BJ, Pai M. New approaches and emerging technologies in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Paediatric respiratory reviews* 2007;8:124–133.
24. Coulter JB. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in young children. *Annals of Tropical Paediatrics* (2008) 28, 3–12
25. Graham SM, Ahmed T, Amanullah F, Browning R, Cardenas V, Casenghi M, Cuevas LM. Evaluation of Tuberculosis Diagnostics in Children: 1. Proposed

Clinical Case Definitions for Classification of Intrathoracic Tuberculosis Disease. Consensus From an Expert Panel. *JID* 2012;205:S199–208.

26. Starke JR. New concepts in childhood tuberculosis. *Current Opinion in Pediatrics* 2007, 19:306–313.
27. Pérez- Vélez CM. Pediatric tuberculosis: new guidelines and recommendations. *Curr Opin Pediatr* 2012; 24:319-28
28. Asturizaga A, Pérez- Fernández LF, Mora- Magaña I. Procedimientos para diagnóstico rápido y de certeza de la tuberculosis pulmonar en el niño. Revisión sistemática de la literatura. Tesis para obtener el Título de Neumología pediátrica. Gestión 2010.
29. Gómez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, Anguita ML, López-Barrio AM, Navarro J et al. Comparison of Amplicor, In-House PolymeraseChain Reaction, and Conventional Culturefor the Diagnosis of Tuberculosis in Children. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:17–22.
30. Neu N, Saiman L, Pablo G.. Diagnosis of pediatric tuberculosis in the modern era.. *Pediatr Infect Dis J* Febrero 1999;18(2):122-6
31. Bolaños M, PenaMJ, Campos-Herrero MI, Lafarga B. Utilidad de la detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante amplificación genómica en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en la infancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000;18:174-6.
32. Nicol MP, Heather JZ. New specimens and laboratory diagnostics for childhood pulmonary TB: progress and prospects. *Paediatric Respiratory Reviews* 2011;12:16-21.
33. Scott LE, McCarthy K, Gous N, Nduna M, Van Rie A, Sanne I et al. Comparison of Xpert MTB/RIF with other nucleic acid technologies for diagnosing pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting: a prospective study. *PLoS medicine* 2011;8:e1001061.
34. Chang K, Lu W, Wang J, Zhang K, Jia S, Li F et al. Rapid and Effective Diagnosis of Tuberculosis and Rifampicin Resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. *Journal of Infection* 2012;doi:10.1016/j.jinf.2012.02.012
35. Nicol MP, Workman L, Isaacs W, Munro J, Black F, Eley B, et al. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases* 2011;11:819–24.

36. Ling DI, Zwerling AA, Steingart KR, Pai M. Immune-based diagnostics for TB in children: what is the evidence?. *Paediatric Respiratory Reviews* 2011;12: 9–15.
37. Imaz MS, Comini MA, Zerbini E, et al. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to the recombinant 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:1036-43.
38. Lagrange PH, Simonney N, Wargnier A, Herrmann JL. Usefulness of serological tests in childhood TB. *Pediatr Pulmonol* 2001;Suppl 23:61–4.
39. Lewinsohna DA, Lobato MA, Jereb JA. Interferon- γ release assays: new diagnostic tests for *Mycobacterium tuberculosis* infection, and their use in children. *Current Opinion in Pediatrics* 2010,22:71–7.
40. Sun L, Xiao J, Miao Q, Feng W-xing, Wu X-rong, Yin Q-qin, et al. Interferon gamma release assay in diagnosis of pediatric tuberculosis: a meta-analysis. *FEMS immunology and medical microbiology* 2011;6:165–73.
41. Kumar R. A simple nomogram for sample size for estimating sensitivity and specificity of medical test. *Indian J Ophthalmol* 2010;58:519-22.
42. Duffau T. Tamaño muestral en estudios sobre pruebas diagnósticas. *Rev Chil Pediatr* 1998;69:122-5.
43. Marais BJ, Gie RP, Hesselning AC, Schaaf HS, Lombard C, Enarson DA et al. A refined symptom-based approach to diagnose pulmonary tuberculosis in children. *Pediatrics* 2006;118:e1350-e1359
44. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2008. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
45. Sreeramareddy, Ramakrishnareddy N, Shah RK, Baniya R, Swain PK. Clinico-epidemiological profile and diagnostic procedures of pediatric tuberculosis in a tertiary care hospital of western Nepal-a case-series analysis. *BMC Pediatrics* 2010;10:57.
46. Bao-Ren N, Chih-Ming C, Yung-Feng H, Kai-Sheng H, Yung-Ching L. Ten-year experience of children with tuberculosis in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009;42:516-520.
47. Marais BJ, Obihara CC, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Lombard C et al. The prevalence of symptoms associated with pulmonary tuberculosis in randomly selected children from a high burden community. *Arch Dis Child* 2005;90:1166–70.

48. Rodríguez MG, Patallo CP, Rizzotti VA, Moscoloni MA, Ballester DS. Pediatric tuberculosis at a reference hospital during the 2004-2008 period. *Rev Argent Microbiol* 2011;43:37-41.
49. Cuevas LE, Browning R, Bossuyt P, Casenghi M, Cotton MF, Cruz AF et al. Methodological Issues for Conducting and Reporting Research Evaluations of Tuberculosis Diagnostics for Intrathoracic Tuberculosis in Children. Consensus From an Expert Panel. *JID* 2012;205:S209-15.
50. Schaaf HS, Marais BJ, Whitelaw A, Hesselning AC, Eley B, Hussey GD et al. Culture-confirmed childhood tuberculosis in Cape Town, South Africa: a review of 596 cases. *BMC Infectious Diseases* 2007;7:140.
51. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Enarson DA, Beyers N. Radiographic Signs and Symptoms in Children Treated for Tuberculosis. Possible Implications for Symptom-Based Screening in Resource-Limited Settings. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25: 237–240.
52. Salazar GE, Schmitz TL, Cama R, Sheen P, Franchi LM, Centeno G et al. Pulmonary Tuberculosis in Children in a Developing Country. *Pediatrics* 2001;108:448–453.
53. Sandgren A, Hollo V, Quinten C, Manissero D. Childhood tuberculosis in the European Union/European Economic Area, 2000 to 2009. *Surveill* 2011;16:pii:9825.
54. Arango M, Amézquita A. Pautas para el estudio de contactos de tuberculosis (Test de Combe). *Pediatría Bogotá* 1995;5:16-21.
55. <http://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/Testing.htm>
56. InDRE. Manual de técnicas de laboratorio para el examen bacilosκόpio. Primera edición; INDRE; México 2003.
57. InDRE. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: Baciloscopía. Organización Panamericana de la Salud; México 2008.
58. InDRE. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 2: Cultivo. Organización Panamericana de la Salud; México 2008.
59. Montaner AE. Lavado Broncoalveolar. Broncoscopía pediátrica. Segunda Edición. España, 2008.
60. Escobar- Gutierrez A, Amezcua- Chavarria ME, Pasten Sanchez S ,Ramirez-Casanova E, Cazares JV et al. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) with Mycobacterial Crude Antigens for the Sero- Epidemiological Diagnosis of Active Tuberculosis. *Int J Lepr* 1996;64:417-27.

61. Cellestis. QuantiFERON®-TB Gold (Método en tubo). FOLLETO Para diagnóstico *in vitro*. http://www.cellestis.com/irm/content/pdf/QFTPI_Spanish.pdf.
62. Rose MV, Kimaro G, Nissen TN, Kroid I, Hoelscher M et al. QuantiFERON-TB Gold In-Tube Performance for Diagnosing Active Tuberculosis in Children and Adults in a High Burden Setting. PLoS ONE 2012;7:e37851.
63. Lighter-Fisher J, Peng CH, Tse DB. Cytokine responses to QuantiFERON® peptides, purified protein derivative and recombinant ESAT-6 in children with tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2010;14:1548- 55.
64. Bates M, O'Grady J, Maeurer M, Tembo J, Chilukutu L et al. Assessment of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis with gastric lavage aspirates in children in sub-Saharan Africa: a prospective descriptive study. Lancet Infect Dis 2013;13:36-42

15. Anexo 1: Definiciones de los resultados positivos del PPD

Induración de 5 mm o mayor

1. Niños con contacto muy cercano con casos contagiosos identificados o sospechados de enfermedad tuberculosa.
2. Niños sospechosos de mostrar enfermedad tuberculosa:
 - a. Signos en las radiografías de tórax compatibles con tuberculosis activa o previamente activa.
 - b. Pruebas clínicas de enfermedad tuberculosa.
3. Niños que reciben inmunosupresores³ o con cuadros de ese tipo, incluida la infección por VIH.

Induración de 10 mm o mayor

1. Niños con mayor peligro de enfermedad diseminada:
 - a. Niños menores de cuatro años
 - b. Niños con otros trastornos clínicos como enfermedad de Hodgkin, linfoma, diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica o malnutrición.
2. Niños con una mayor exposición a enfermedad tuberculosa:
 - a. Niños nacidos (o cuyos padres nacieron) en regiones de elevada prevalencia en el mundo
 - b. Niños frecuentemente expuestos a adultos infectados por VIH, sin hogar, consumidores de drogas ilícitas, residentes en asilos, encarcelados o en diversas instituciones de custodia o trabajadores agrícolas migrantes
 - c. Niños que han viajado a regiones de elevada prevalencia en el mundo

Induración de 15 mm o mayor

1. Niños de cuatro años o mayores, sin factores de riesgo

16. Anexo 2: Toma de muestra para cultivo de M. tuberculosis

Espuito inducido

En niños desde los 6 meses de edad, con sospecha de TBP, el empleo de la técnica de inducción del esputo, es recomendado.

Procedimiento

1. Con el paciente en ayuno (mínimo de 3 horas), se aplican nebulizaciones con un micronebulizador utilizando una preparación de 5 mL de solución salina hiperosmolar al 5% adicionada con salbutamol (0.3 mL para niños menores de 2 años y 0.5 mL en los mayores) para contrarrestar el broncoespasmo que eventualmente puede presentarse con la solución hiperosmolar, más oxígeno, a razón de 3 litros por minuto, durante 15 minutos.
2. Se realiza palmo percusión en la pared anterior y posterior del tórax, durante tres a cinco minutos.
3. El moco se obtiene mediante una sonda estéril con calibre 6 o 7 por aspiración nasofaríngea; se debe tomar una muestra diaria durante tres días.

Aspirado gástrico

Procedimiento

1. Se debe programar el procedimiento para que la muestra sea entregada en el laboratorio en un máximo de 30 minutos posteriores a la toma; en caso de no ser factible, mantenga la muestra en refrigeración a 4-8 grados centígrados
2. Mantener al niño en decúbito dorsal y colocar la sonda con dos horas de anticipación, previas a la toma de la muestra. Confirmar la ubicación en el estómago (aspecto y PH del contenido) para obtener al menos 20 mL de líquido. Si es menor cantidad, inyecte 10-30 mL de solución salina y después de 2 a 3 minutos aspirar nuevamente. Colocar en el frasco estéril.
3. La muestra se debe tomar cada 24 horas durante tres días.

Broncoscopía

Se debe programar el procedimiento, el paciente debe contar con biometría hemática, tiempo de coagulación y protrombina, así como el tiempo de ayuno necesario. El procedimiento se realiza en la sala de endoscopia o quirófano; bajo sedación profunda y analgesia.

El hallazgo endoscópico de disminución del calibre del bronquio se interpreta como compresión extrínseca por crecimiento ganglionar y se realiza lavado bronquioalveolar con cepillado para estudio histopatológico y cultivo.

Procedimiento de lavado bronquioalveolar

1. Se debe efectuar antes que otras técnicas (biopsia, cepillado o punción) que podría provocar hemorragias y falsear los resultados del lavado.
2. Localización del lavado: En niños con lesión pulmonar localizada efectuar en el segmento o lóbulo más afectado. Cuando se trata de una enfermedad difusa, los segmentos más apropiados son el lóbulo medio y la llingula, tanto por su accesibilidad y facilidad para la impactación del broncoscopio, como por la mayor recuperación del líquido instilado en ellos.

3. Líquido utilizado y métodos de instilación y recuperación: El suero salino isotónico estéril (CINa 0,9%), a temperatura ambiente, o a temperatura corporal (37°C) se introduce con una jeringa a través del canal de trabajo del broncoscopio, en forma de embolada, seguida por la instilación de una cantidad de aire suficiente que asegure el vaciado de todo el canal de succión. La recuperación del líquido mediante aspiración por un sistema de varios recipientes interconectados, unidos a su vez por uno de sus extremos con el canal de trabajo del broncoscopio, y por el otro con un aspirador, al que se aplica, de forma intermitente, una presión negativa entre 25 y 100 mm Hg.
4. Volúmenes de líquido. 0.25-1 mL/kg/alícuota, con volúmenes finales que oscilan entre el 10-15% de la capacidad residual funcional.

17. Anexo 3: Transporte de las muestras

Envase

Debe tener las siguientes características:

1. Boca ancha: de no menos de 50 mm de diámetro
2. Capacidad entre 30 y 50 ml: para facilitar que el paciente pueda depositar la expectoración con facilidad dentro, sin ensuciar sus manos o las paredes del frasco y para que en el laboratorio se pueda seleccionar y tomar la partícula más adecuada, con comodidad, para realizar el extendido.
3. Cierre hermético: con tapa a rosca, para evitar derrames durante el transporte y la producción de aerosoles cuando se abre en el laboratorio. Las tapas a presión generan mayor riesgo de formación de aerosoles y salpicaduras en el momento de ser retiradas
4. Material plástico transparente, resistente a roturas, para poder observar la calidad de la muestra cuando la entrega el SR, evitar roturas y derrames de material infeccioso y para que pueda ser desechado. No se recomienda lavar y reutilizar frascos de vidrio, para evitar posibles errores en la baciloscopía originados en la transferencia de material de una muestra a otra y minimizar la manipulación de material potencialmente infeccioso.
5. Cada envase debe ser transportado en una bolsa de plástico sellada con una liga.

Transporte

Se deben programar los días de la semana en los que se efectuarán regularmente los envíos, el medio de transporte y el horario de salida y de llegada. Si los envíos no se hacen regularmente es conveniente que el laboratorio que va a recibir las muestras sea advertido previamente.

Se debe considerar dos puntos importantes en el transporte de las muestras protección del calor excesivo y de la luz solar y la eliminación del riesgo de derrame.

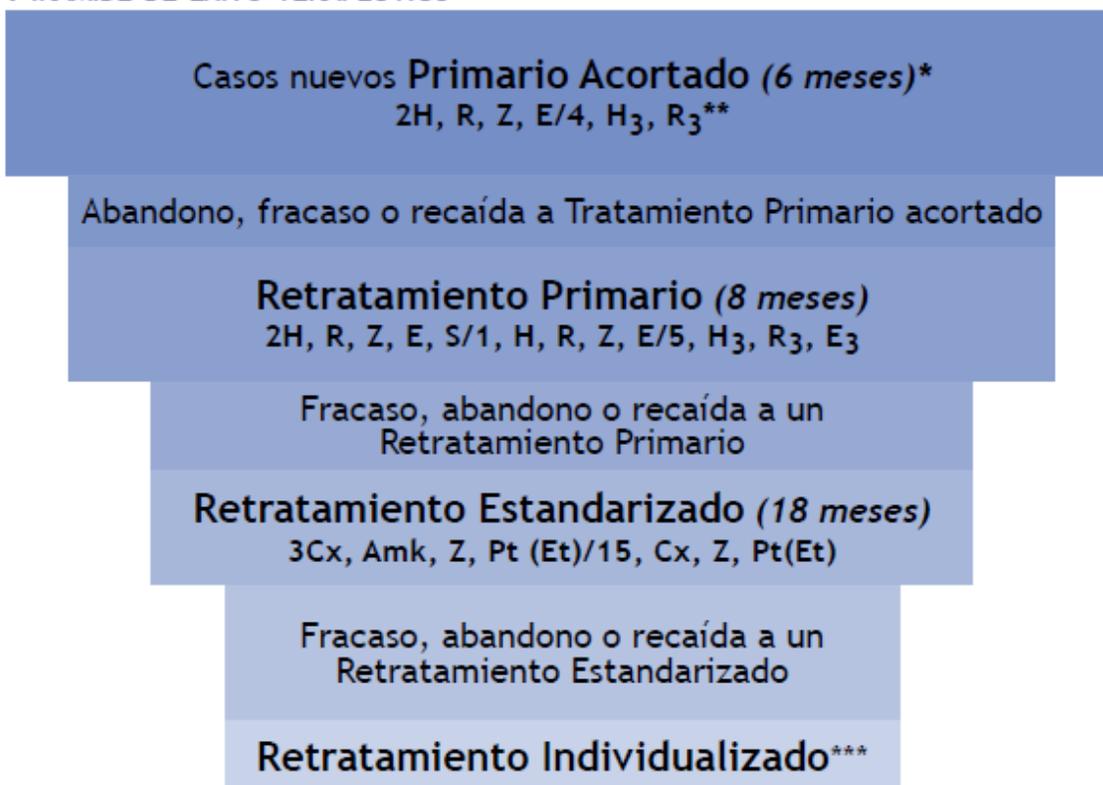
Se puede utilizar para el transporte una caja de metal o una de plástico opaco, con algún mecanismo que trabase su tapa, y con una manija para facilitar su acarreo, como las que son utilizadas para trasladar material refrigerado o herramientas. También son útiles las cajas de plástico con tapa de cierre hermético, del tipo de las que se utilizan en el hogar para conservar alimentos u otros enseres, de altura ligeramente superior a la de los envases de las muestras. Estas cajas son fácilmente decontaminables por lavado con solución de hipoclorito de sodio. En el interior de las cajas se adapta una plancha en la que se cortan círculos de diámetro adecuado como para que encajen en ellos los envases de las muestras dentro de sus bolsas. Luego se rellena los espacios entre los envases con papel absorbente. Cada envío debe ser acompañado por las hojas de solicitud de examen correspondiente o al menos por una lista con los datos de los pacientes: nombre y apellido, servicio, aclaración sobre si es muestra para diagnóstico (1ª, 2ª o 3ª) o para control de tratamiento indicando el mes. Los formularios deben ser enviados en un sobre, fuera de la caja que contiene los envases de las muestras.

18. Anexo 4: Tratamiento

El tratamiento incluye fármacos bactericidas y bacteriostáticos, que combinados proporcionan una rápida cura microbiológica y menor duración del tratamiento. La cooperación de la familia y apego al tratamiento es de vital importancia para la curación. En menores de 8 años los fármacos deben administrarse en presentación separada y el horario se debe ajustar a las necesidades del paciente para favorecer el apego al tratamiento. Se debe administrar la dosis completa (no fraccionada), preferentemente en ayunas.

Para seleccionar el esquema, se debe identificar si la presentación es pulmonar o extrapulmonar y si se trata de un caso nuevo, de reingreso, fracaso, recaída o multitratado.

PIRÁMIDE DE ÉXITO TERAPÉUTICO



H: isoniazida; R: rifampicina; Z: pirazinamida; E: etambutol; S: estreptomina; Cx: ciprofloxacino; Amk: amikacina; Pt: protionamida; Et: etionamida. *Excepto en formas graves: Meníngea, Ósea y Miliar (diseminada). **El número previo al esquema se refiere a los meses de duración y el número como subíndice después del fármaco se refiere a las dosis administradas por semana. ***Ante la resistencia a la H se recomienda administrar un esquema combinado con 4 fármacos que incluyan al menos dos bactericidas y uno inyectable. Ante la resistencia a la R se puede agregar H al esquema

19. Anexo 5: Carta de consentimiento informado

UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL ESTUDIO DEL PACIENTE PEDIÁTRICO CON SOSPECHA DE TUBERCULOSIS PULMONAR

Su hijo(a) _____ está siendo evaluado (a) con estudios de gabinete y laboratorio para confirmar o descartar la enfermedad denominada: Tuberculosis pulmonar, por lo cual se le invita a participar en el proyecto de investigación : UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL ESTUDIO DEL PACIENTE PEDIÁTRICO CON SOSPECHA DE TUBERCULOSIS PULMONAR.

Este estudio de investigación es realizado por los doctores: Lorenzo Pérez Fernández, María Dolores Correa Beltrán, Mónica Adriana Asturizaga Mallea, Ignacio Mora Magaña y Alejandro Gutiérrez Escobar.

La participación de su hijo(a) en este estudio es completamente voluntaria. Le solicitamos lea detenidamente la siguiente información, y haga preguntas acerca de cualquier cosa que no esté clara, antes de decidir si acepta o no participar.

Propósito del estudio

Este estudio está ideado para determinar cual método de diagnóstico permite llegar al diagnóstico de tuberculosis pulmonar de manera rápida y certera.

Procedimientos

En el estudio de un niño con sospecha de tuberculosis pulmonar se realiza los siguientes procedimientos de **manera habitual**: una radiografía de tórax, prueba de tuberculina (aplicación de un reactivo por debajo de la piel por medio de un piquete que se debe dar lectura a las 72 horas), cultivo de tres muestras de aspirado gástrico (se colocará una sonda por la nariz hasta el estómago de su hijo(a), en caso que su niño pueda expectorar se tomará muestra de esputo inducido (se estimulará con una nebulización con salbutamol la expulsión de la flema) o en caso de ser necesario se realizará una broncoscopia (procedimiento endoscópico bajo anestesia general); para llegar al diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

En caso que se sospeche de Tuberculosis pulmonar, se debe iniciar tratamiento antituberculoso. Este tratamiento es largo, de ocho meses, tiene una primera fase que dura dos meses y se toman cuatro medicamentos y una segunda fase que dura seis meses que y se toman 2 medicamentos. Al terminar la primera fase se realizará un nuevo control de radiografía y cultivo de esputo o aspirado gástrico.

Es necesario recalcar que estos son los procedimientos diagnósticos y terapéuticos se realizan a cualquier niño con sospecha de Tuberculosis, en este estudio estamos añadiendo tres pruebas diagnósticas, PCR y ELISA para *M. tuberculosis*, y QuantiFERON- TB Gold. Si usted acepta que su hijo (a) ingrese al estudio se realizará una historia clínica con nuevas preguntas, se tomará una parte del contenido del aspirado gástrico, esputo o aspirado bronquial para realizar cultivo y PCR para *M. tuberculosis*; además se tomará una muestra de sangre para realizar la prueba de QuantiFERON- TB

Gold B y ELISA para *M. tuberculosis*; la cantidad de sangre que se extraerá es de 5mL o aproximadamente una cucharadita. Estas pruebas se realizarán en el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica y en el Instituto Nacional de Pediatría.

Riesgos y malestares potenciales

Extracción de sangre. Esta se realizará con la técnica de venopuntura habitual, para la cual primero se asear la región y se utiliza material (jeringa, aguja y algodón) nuevo. El personal que realizará este procedimiento está perfectamente entrenado para llevarlo a cabo, sin embargo su hijo(a) tendrá un poco de molestia debido al piquete. Su hijo(a) podría presentar un moretón o referir dolor en el lugar del cual se sacó la sangre.

Beneficios que se anticipan para los sujetos

La tuberculosis es una enfermedad que no es fácil de identificar en niños, aun cuando se puede sospechar su presencia. Este estudio busca identificar las pruebas diagnósticas más certeras para llegar al diagnóstico de manera rápida y así iniciar tratamiento de manera oportuna, para evitar complicaciones. No existe un beneficio directo para el participante, porque las pruebas diagnósticas que se le realizarán están en evaluación.

Resultados

Se le entregará una copia de los resultados de los exámenes de su hijo (a), aunque estos hayan salido positivos o negativos; también se adjuntará una copia al expediente clínico para el conocimiento de los médicos tratantes.

Alternativas de la participación

Usted puede decidir que no quiere que su hijo(a) participe y esto no afectará de ninguna manera la atención que ahora recibe; como tampoco la participación en este estudio no afectará la clase de atención que su hijo(a) recibe para su enfermedad.

Pago por participar

No se le cobrará por las tres pruebas diagnósticas que estamos evaluando en este estudio.

No hay pago alguno por participar.

Anonimidad y confidencialidad

Las únicas personas que sabrán que su hijo(a) es un sujeto bajo investigación, son los miembros del grupo de investigación, sus médicos tratantes y enfermeras. Ninguna información acerca de usted o proporcionada por usted durante la investigación será divulgada a otros sin su permiso por escrito, exceptuando si es necesario notificar el caso a las autoridades, por tratarse de una enfermedad con control epidemiológico.

Cuando los resultados de la investigación se publiquen o se presenten en conferencias no se incluirá información que divulgue la identidad de su hijo(a).

Guardaremos toda la información acerca de su hijo(a) en archiveros con llave y computadoras con contraseñas protegidas. La muestra de sangre se desechará posterior

al concluir las pruebas y el aspirado gástrico o esputo de su hijo(a), en caso de ser positivo, se debe guardar el cultivo por cinco años por reglamento del InDRE.

Participación y retiro

La participación de su hijo(a) en esta investigación es voluntaria. Si decide no participar, esto no afectará su relación con el Instituto Nacional de Pediatría, o el derecho de su hijo(a) a servicios de salud y otros servicios a los cuales tiene derecho. Si usted decide que su hijo(a) participe, tiene la libertad de retirar su consentimiento y suspender su participación en cualquier momento, sin perjuicio a su atención futura en el Instituto Nacional de Pediatría. Usted no renuncia a ninguno de sus reclamos legales, derechos o remedios debido a la participación de su hijo(a) en este estudio de investigación.

Personal de contacto para dudas y aclaraciones de la investigación

Si usted tiene preguntas relacionadas con la investigación, o si su hijo presentó alguna molestia relacionada con la toma de muestra, por favor siéntase con la libertad de comunicarse con:

Dr. Lorenzo Pérez Fernández. Servicio de Neumología y Cirugía de tórax. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3,700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacan, México, D.F. Teléfono: 1084-0900 Ext. 1321, 1324

Dra. Mónica Adriana Asturizaga Mallea. Servicio de Neumología y Cirugía de tórax. Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3,700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacan, México, D.F. Teléfono: 1084-0900 Ext. 1321, 1324, Cel. 044-5519356435

Personal de contacto para dudas sobre los derechos como participante en la investigación

Dra. Matilde Ruiz García, Presidente del Comité de Ética. Insurgentes Sur 3,700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacan, México, D.F. Teléfono: 1084-0900 Ext. 1581

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

AL FIRMAR ESTE FORMULARIO YO CONSIENTO VOLUNTARIAMENTE EN QUE MI HIJO(A) PARTICIPE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA.

Nombre Completo del Niño

Nombre completo y firma del Padre, Madre o Tutor

Fecha

Nombre completo y firma del Padre, Madre o Tutor

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre completo del encargo de obtener el CI

Firma del Investigador

Fecha (debe ser la misma que la del sujeto)

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre completo y firma del Testigo 1

Parentesco con el participante

Fecha (debe ser la misma que la del sujeto)

Nombre completo y firma del Testigo 2

Parentesco con el participante

Fecha (debe ser la misma que la del sujeto)

20. Anexo 6. ELISA para *M. tuberculosis*

Antígeno

Esta prueba utiliza un extracto soluble de BCG. El *Mycobacterium bovis* se obtiene de una cepa Danesa ATCC 1331, que se cultiva en un medio líquido Sauton, con un pH 7.2 durante 5 a 6 semanas de cultivo a 37°C. Al término del cultivo se cosecha bajo procedimientos estándares y para matar bacterias, la masa bacilar es expuesta a una fuente de rayos gamma hasta alcanzar una dosis efectiva de 2.5 Mrd, la masa bacilar se rompe por ultrasonido a 100 watts durante 10 minutos a intervalos de 30 segundos, en baños de hielo. A la solución antigénica se le adicionan inhibidores de proteasas, se centrifuga a 10000rpm y el sobrenadante es pasado por membrana de 0.22 µm de poro. La concentración proteica se ajusta a 10mg/mL, se fracciona en alícuotas y se almacena a -70°C.

Procedimiento

Se sensibiliza la placa con la solución de ESBCG a una concentración de 5µg/mL, en regulador de carbonatos y se añade 100 µL por pozo e se incuba 18h a 4°C, posteriormente se elimina la solución antigénica y se lava 2 veces la placa con 200 µg/pozo de PBS-Tween 0.1%. Luego se agrega 100 µL por pozo de los sueros control y problema diluido 1/500 en PBS-Tween 0.1%- leche 2.5% e se incuba 1 hora a 37°C. Al concluir el tiempo se elimina la solución de sueros control y problema; posteriormente se lava la placa 3 veces con 200 µL/pozo de PBS-Tween 0.1% y se agrega el conjugado antiinmunoglobulinas humanas en cabra marcadas con peroxidasa diluido 1/7000 en PBS-Tween 0.1%-leche 2.5% colocando 100uL/pozo, para incubar la placa durante 1 hora a 37°C. En seguida se elimina la solución de conjugado y se lava 3 veces con 200uL/pozo de PBS, luego se agrega 100µL/pozo de la solución de sustrato e incubar 30 min a 37°C, posteriormente se detiene la reacción con 50µL/pozo de la solución de ácido sulfúrico 4N. Para terminar se lee la placa a una longitud de onda de 492nm y se registra la densidad óptica promedio de cada muestra procesada por duplicado.

Control y validación de la prueba

Se cuantifica el error (coeficiente de variación) tanto en la réplicas de la muestras problema como en las de los testigos. Estos valores permiten validar de los resultados al determinar la precisión, exactitud y reproducibilidad. En la evaluación intraplaca el coeficiente de variación para aceptar o rechazar las réplicas es igual o por abajo del 10% de variación y en la evaluación interplaca se acepta la corrida del día si tiene una variabilidad del 10% o menos.

21. Anexo 7. QuantiFERON- TB Gold y cuantificación de citocinas

El ensayo QuantiFERON -TB Gold y la cuantificación de citocinas se divide en dos etapas; la primera consiste en la recolección e incubación de las muestras y la segunda es propiamente, el proceso de cuantificación de las citocinas.

Recolección e incubación de muestras

El QuantiFERON-TB Gold incluye los siguientes tubos de recolección:

1. Tubo nulo (sin antígeno, ni mitógeno)
2. Tubo con antígenos de tuberculosis (ESAT-6, CFP-10 y TB7.7)
3. Tubo con mitógeno ó control positivo (fitohemaglutinina)

Se toman 3 ml de sangre por venopunción, inmediatamente después se coloca 1 ml de la misma directamente en cada tubo de recolección del QuantiFERON -TB Gold; se mezcla el contenido de los tubos agitando durante 5 segundos (ó 10 veces). Posteriormente, se coloca los tubos en la incubadora a 37° C durante 24 h lo antes posible, (siempre dentro de las 16 horas posteriores a la toma de la muestra). Finalmente, se separa el plasma por centrifugación y congela las muestras hasta su procesamiento.

Cuantificación de citocinas

Se cuantifican las citocinas Th1/Th2 e inflamatorias producidas por estimulación con el antígeno por medio citometría de flujo (CBA-Cytometric Bead Array).

Durante el ensayo se mezcla un conjunto de perlas acopladas a anticuerpos de captura específicos dirigidos contra las citocinas Th1/Th2 (BD 550749, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ) y citocinas inflamatorias (BD 551811, IL-8, IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-10 e IL-12p70), posteriormente se incuban con los estándares recombinantes o muestras problema, inmediatamente después, se coloca el anticuerpo secundario o de detección acoplado a ficoeritrina para formar un complejo de sándwich, se incuba durante tres horas. Al final de este tiempo, las muestras se lavan por centrifugación con el amortiguador de lavado incluido en el kit. Las muestras se leen en un citómetro de flujo. La intensidad de fluorescencia de cada complejo revela la concentración de la citocina. El análisis y cálculo de la concentración de las citocinas, se realiza con el programa FCAP de BD.

22. Anexo 8. Hoja de recolección de datos

Nombre		Edad	
Número de registro		Número de paciente	
Clínica		Si/No	Observaciones
1	Tos		Duración
2	Fiebre		Duración, Grado
3	Pérdida de peso		Percentil
4	Fatiga		Duración
5	Nódulos linfáticos		Localización
6	Antecedente de BCG		
Radiología		Si/No	Observaciones
1	Fuertemente sospechoso		Descripción
2	Sospechoso		Descripción
Epidemiología		Si/No	Observaciones
1	Contacto de tuberculosis		Tiempo
2	PPD		
Muestra para baciloscopía y cultivo		Si/No	
1	Aspirado gástrico		
2	Esputo inducido		
3	Lavado broncoalveolar		
Pruebas de laboratorio		Positivo/Negativo/Dudoso	Observaciones
1	Baciloscopía		Bacilos por campo
2	Cultivo		
3	PPD		Reactividad (mm)
4	PCR en punto final para <i>M. tuberculosis</i>		Carga bacteriana
5	ESLISA para <i>M. tuberculosis</i>		Absorbancia (Densidad óptica)
6	QuantiFERON- TB Gold		Absorbancia (Densidad óptica)