



Estudio bacteriológico del paciente pediátrico con diagnóstico probable de tuberculosis

García-González Rafael,* Nájera-Garduño María del Consuelo,[‡] Arzate-Barbosa Patricia,[‡] Reyes Torres Angélica*

Palabras clave:

Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, baciloscopia, reacción en cadena de la polimerasa.

Key words:

Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, microscopy morphology, polimerase chain reaction.

* Laboratorio de la Coordinación de Enseñanza, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México.

[‡] Departamento de Análisis Clínicos y Pruebas especiales, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México.

Correspondencia: Rafael García-González, Facultad de Medicina, Edificio A, Primer piso, Universidad, Núm. 3000, Circuito Interior, 04510, Ciudad de México, México. Tel. 5623 2390 E-mail: rafagargon@hotmail.com

Recibido: 28/02/2017

Aceptado: 22/03/2017

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa transmitida principalmente a través de vías aéreas considerada un problema de salud pública. La diseminación de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de pacientes altamente bacilíferos es determinante en el niño que funge como reservorio de los futuros casos de tuberculosis, por lo que su diagnóstico en estos pacientes es fundamental para su detección con el fin de establecer el tratamiento correcto y oportuno. Aun cuando se cuenta con técnicas de diagnóstico sencillas y precisas y con tratamientos eficaces, el diagnóstico de tuberculosis en el paciente pediátrico es difícil. La sintomatología y los datos revelados durante la exploración física son inespecíficos y poco significativos en las formas leves y moderadas de la enfermedad. Ante esta situación, la información disponible del paciente pediátrico es limitada, lo que ocasiona que sea olvidado, que por su naturaleza no infecciosa no se le incluya en los programas o se le considere sin riesgo para la salud pública. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en pacientes pediátricos con el fin de confirmar el diagnóstico clínico de tuberculosis. La metodología empleada fue la obtención de muestras provenientes del aparato respiratorio, determinación fenotípica de *M. tuberculosis* (tinción de Ziehl-Neelsen, cultivo en medio líquido y sólido e identificación bioquímica), así como la determinación genotípica mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados obtenidos fueron 13.4% de positividad para la baciloscopia, 43% para el cultivo y 57% para la PCR. **Conclusión:** De las tres pruebas aplicadas, la baciloscopia fue la menos sensible y la PCR fue la más alta; sin embargo, la diferencia es mínima con respecto al cultivo.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease transmitted mainly through airways and considered a public health problem. The spread of *Mycobacterium tuberculosis* from highly smear-positive patients is decisive in children infected considered the reservoir of future cases of tuberculosis, so his diagnosis in these patients, it is essential for detection in order to provide the correct treatment and timely. Although there are simple techniques, accurate diagnosis and effective treatment with the diagnosis of tuberculosis in pediatric patients it is difficult. The symptoms, the data found during physical examination are nonspecific and insignificant in the mild and moderate forms of the disease. In this situation, the account information that pediatric patient is limited which makes this be forgotten, for its non-infectious nature, not having been considered or no risk to public health programs. The aim of this work was to determine the presence of BAAR in pediatric patients in order to confirm the clinical diagnosis. The methodology used was to obtain samples from respiratory, phenotypic determination of *M. tuberculosis* (Ziehl-Neelsen, culture in liquid and solid media and biochemical identification) and genotypic determination with the use of chain reaction (PCR). The results obtained were 13.4% for smear positivity, 43% for cultivation and 57% for PCR. **Conclusions:** Of the three tests applied smear was the least sensitive and PCR was the highest, but there is little difference from the crop.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa transmitida principalmente a través de vías aéreas.¹ Se le considera uno de los grandes problemas de salud pública, ya que un tercio de la población mundial se encuentra infectada y cada año surgen nueve millones de nuevos casos, de los cuales apro-

ximadamente dos millones fallecen por esta enfermedad.² Desde el año 2000, 22 países presentan 80% del total de casos de tuberculosis a nivel mundial. En la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis*, los pacientes altamente bacilíferos (adultos, niños con tuberculosis congénita y niños mayores con tuberculosis semejante a la del adulto) generan expectoraciones con cerca de 100,000

bacilos ácido alcohol resistentes por mililitro (BAAR/mL), que en ambientes cerrados son determinantes en la transmisión del padecimiento y es del niño infectado con *M. tuberculosis* considerado el reservorio de quien se originarán los futuros casos de tuberculosis, por lo que el diagnóstico en estos pacientes es fundamental en la detección de la infección con el objeto de establecer el tratamiento correcto y oportuno.^{1,3-10}

Se ha estimado que 550,000 casos se presentaron en niños, lo que equivale al 6% del total con 80,000 decesos,^{11,12} quienes muestran inicialmente una infección primaria, casi siempre pulmonar, carente de elementos clínicos y radiológicos en las primeras semanas y sólo la prueba de la tuberculina es positiva entre la segunda y sexta semana. En los niños menores de cinco años de edad el comportamiento epidemiológico, la presentación clínica y otros elementos de diagnóstico de tuberculosis son diferentes a los del adulto. De ahí el nombre de sintomáticos respiratorios (SR).^{7,12,13} Frente a esta situación, la información disponible del paciente pediátrico es limitada, por tal motivo estos pacientes son olvidados, por su naturaleza no infecciosa no se les incluye en los programas o se les considera sin riesgo para la salud pública.¹⁴ Aunque se dispone de técnicas de diagnóstico sencillas y precisas, así como con tratamientos eficaces, el diagnóstico de tuberculosis en el paciente pediátrico es difícil.^{15,16} Por esta razón durante mucho tiempo estos pacientes quedaron excluidos de toda estadística y por ende de tratamiento, ya que sólo se consideraba como tuberculosis aquella demostrada por baciloscopia positiva, situación que se observa con poca frecuencia en tuberculosis infantil de tipo primaria por ser pacientes paucibacilares. Por otro lado en el diagnóstico microbiológico de tuberculosis se requiere una muestra apropiada cuya obtención se dificulta en el paciente pediátrico, lo que propicia disminución en el número de baciloscopias y cultivos positivos, como lo refiere A Mukherjee y otros autores.^{4,8,9,17-23} A estas dificultades se agrega el tiempo prolongado de incubación que requiere el cultivo convencional, aun cuando se empleen sistemas automatizados.²⁴⁻²⁶ En consecuencia la aplicación de la biología molecular es una alternativa para detectar e identificar *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas y de cultivo.^{15,27-30}

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de BAAR en pacientes pediátricos con el fin de confirmar el diagnóstico clínico de tuberculosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa de referencia y control: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Muestras clínicas: Se emplearon muestras provenientes de vías respiratorias, lavado gástrico, aspirado broncoalveolar, expectoración y líquido pleural de 82 pacientes de ambos sexos, 51% del sexo masculino y 49% del femenino, de edad comprendida entre 3 meses y 17 años, con diagnóstico presuntivo de tuberculosis (Figura 1). El número promedio de muestras por paciente fue de tres. Éstas se recibieron en frascos de boca ancha con tapón de rosca, estériles de acuerdo con las especificaciones requeridas.^{7,10,26,31} Todas ellas fueron sometidas a descontaminación y concentración con el método de Petroff, se empleó hidróxido de sodio al 4.0% (NaOH 4.0 g, agua destilada c.b.p. 1,000 mL, rojo de fenol 0.04 g) y neutralización con ácido clorhídrico al 1 N (HCl 36.5 mL y agua destilada c.b.p. 1,000 mL).^{24,26,31}

Las muestras descontaminadas se sometieron a centrifugación (3,000 rpm) durante 15 minutos. Ya descontaminadas y concentradas se les practicó frote, tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo. En un vial de 1.5 mL se almacenó aproximadamente 1.0 mL de la muestra a < 20 °C. A partir de este material se realizó lisis celular para obtener ácido desoxirribonucleico (ADN) y efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los pasos a seguir fueron los siguientes: el frote fue fijado con calor y se efectuó tinción de Ziehl-Neelsen utilizando fucsina fenicada (fucsina básica 3.0 g, etanol 95% 100 mL, fenol acuoso 55 mL y agua destilada hasta completar 1,000 mL). Como solución decolorante (alcohol ácido). Ácido clorhídrico (30 mL) y etanol 95% (970 mL). Como colorante de contraste se usó azul de metileno (azul de metileno 1.0 g y etanol 95% 100 mL).^{6,24} Posteriormente se procedió a observación microscópica, para lo cual se empleó microscopio Olympus e inmersión de acuerdo con lo recomendado por la literatura.^{6,24}

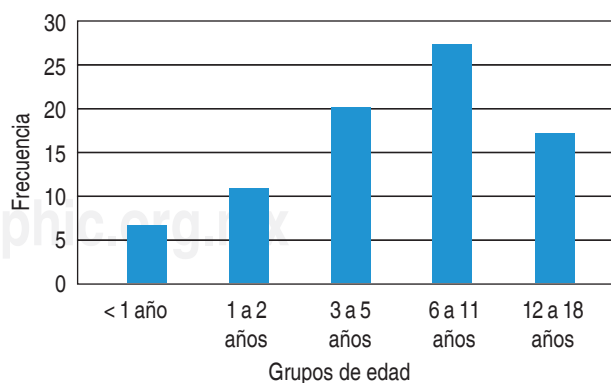


Figura 1. Frecuencia de pacientes con tuberculosis estudiados por grupos de edad.

Para el cultivo de la muestra se usó el medio sólido de Lowenstein-Jensen (LJ) que fue inoculado con 0.15-0.3 mL de la muestra descontaminada y concentrada.^{24,26,31} Su incubación se obtuvo a una temperatura de 35-37 °C, colocando los tubos inclinados una vez que fueron inoculados para asegurar que la muestra cubriera toda la superficie del medio y con los tapones flojos para lograr una concentración adecuada de oxígeno. La revisión de los cultivos se realizó a las 48 horas, a 7, 30 y 63 días, tiempo final para descartar todos aquéllos que fueron negativos.^{24,26,31}

De manera paralela se empleó el Sistema de MB/BacT (caldo Middlebrook 7H9) con suplemento liofilizado que contenía amfotericina B (0.0180% peso/volumen), azlocilina (0.0034% peso/volumen), ácido nalidíxico (0.04% peso/volumen), polimixina B (10,000 unidades) y trimetoprima (0.0105% peso/volumen). Solución reconstituyente MB/BacT, compuesto de Tween 80 (0.4% peso/volumen), glicerol (5% peso/volumen) y amaranto en agua (0.002% peso/volumen) de Organon Teknika. Una vez inoculados se incubaron a 37 °C durante 56 días. Su monitoreo fue continuo (cada 10 minutos), detectándose la producción de dióxido de carbono como producto del desarrollo de *Mycobacterium*.³¹

Todos los medios de cultivo, tanto positivos como negativos en LJ y MB/BacT fueron sometidos a tinción de Ziehl-Neelsen al finalizar el periodo de incubación para su observación microscópica. Se procedió enseguida a las pruebas bioquímicas a partir de los cultivos positivos; niacina, catalasa a 68 °C y reducción de nitratos con las que se evidenció *M. tuberculosis*, que el caso del medio de LJ permitió además verificar el tiempo de desarrollo, la morfología rugosa de la colonia incolora y el arreglo en cordón observado a partir del medio líquido.^{24,27,31}

Previo a la extracción del ADN la muestra fue lavada con amortiguador TE pH 8.0 (Tris Cl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0).

La lisis celular se realizó con el amortiguador TE pH 8.0, lisozima al 3.3% en TE, pH 8.0, duodecilsulfato de sodio al 20% y perclorato de sodio 5 M. La extracción final se efectuó con fenol cloroformo alcohol isoamílico (24:23:1), cloroformo alcohol isoamílico (1:1) y precipitación con acetato de sodio 3M, pH 5.2, etanol absoluto y etanol al 75%.^{31,32} La concentración del producto fue calculada por espectrofotometría a 260 nm (DU-65 Spectrophotometer Beckman).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtuvo mediante los iniciadores IS1 e IS2 que permitieron amplificar un fragmento de 123 pares de bases (pb) de ADN de la secuencia de inserción 6110 (IS 6110) del Complejo *M. tuberculosis*.³³ El procedimiento seguido

de manera breve fue el siguiente: la mezcla con la que se trabajó se preparó empleando el amortiguador de reacción 10X que contenía MgCl₂ 25 mM/L, trifosfatos de desoxinucleótidos 1.25 mM/L, iniciadores IS1 5'CCTGCCGACCGTAGGCGTCGG 3' e IS2 5' CTCGTC CAGCGCCGCTTCGGG 3' (Lakaside) 10 pmoL/μL de cada uno, Taq polimerasa 5 U/mL (Fermentans), ADN blanco 10 pmoL y agua libre de nucleasa.^{31,32}

El volumen final fue de 50 μL y la reacción se efectuó en un termociclador Axygen Maxygene, Therm-1001. Iniciando la desnaturalización a 95 °C durante cinco minutos. Seguido de 32 ciclos de desnaturalización a 95 °C, alineación a 68 °C y extensión a 72 °C por un minuto cada paso. La extensión se prolongó por dos segundos cada ciclo y al final se incluyó una extensión de ocho minutos.^{31,32}

La detección del producto se realizó con electroforesis en geles de Agarosa ultrapura (GIBCO/BRL) al 2%. Teñido con bromuro de etidio (Sigma) y visualizado usando un Gel Doc XR. Bio Rad, Hércules, CA, USA.^{31,32,34-36}

RESULTADOS

Se estudiaron muestras clínicas provenientes de un total de 82 pacientes, 40 del sexo femenino y 42 del sexo masculino, con un rango de edad entre 3 meses y 17 años y con diagnóstico probable de tuberculosis (*figura 1*). El número de muestras por cada paciente fue de tres.

Desde el punto de vista bacteriológico (*figura 2*) se detectaron 11/82 pacientes con baciloscopias positivas a BAAR a través de los frotis teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen, lo que corresponde al 13.4% del total de los pacientes estudiados (*figura 3*). En tanto que 35/82, 43% de los pacientes fueron positivos al cultivo, confirmando la especie *M. tuberculosis* mediante la identificación bioquímica.

La amplificación del ADN de los lisados obtenidos directamente de las muestras clínicas empleando la

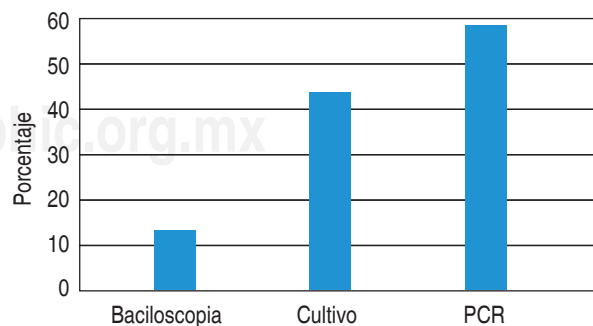


Figura 2. Resultados positivos de las pruebas bacteriológicas realizadas.

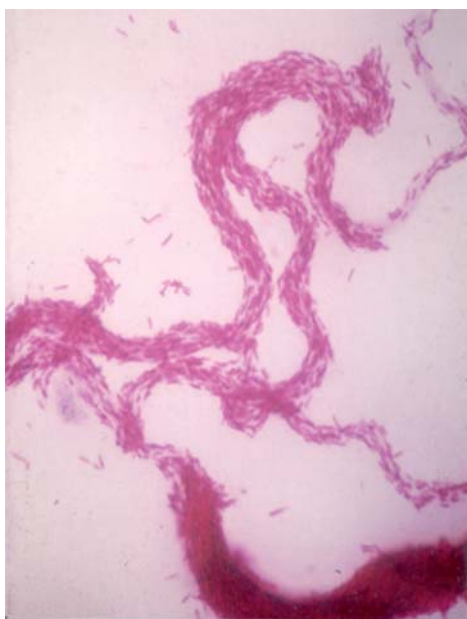
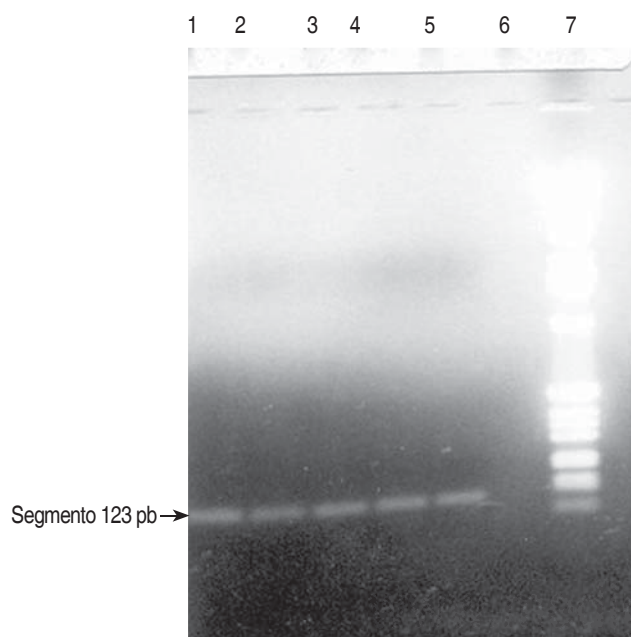


Figura 3. Tinción de Ziehl-Neelsen de frote realizado a partir de cultivo líquido empleado en el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis*.



1. *M. tuberculosis* H37Rv. 2. 1LG. 3. 2LG. 4. 3 LG. 5. LG, 6. Control negativo, 7. Marcador de peso molecular.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de productos de 123 pares de bases (pb), obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), teñidos con bromuro de etidio, con empleo de IS6110.

IS6110 puso de manifiesto la presencia de un fragmento de 123 pares de bases (pb) en 47/82 de las muestras que corresponde al 57% del total de éstas (figura 3). Procedimiento que también fue empleado en la confirmación en los cultivos puros obtenidos, poniendo en evidencia la presencia del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (figura 4).

DISCUSIÓN

La tuberculosis es una enfermedad altamente contagiosa cuya principal vía de transmisión es la aérea, se adquiere a partir de la expectoración de pacientes altamente bacilíferos con lesiones abiertas.^{3,7,37-39} Su localización más frecuente es la pulmonar (80-85%)⁷ y el niño es considerado «el centinela de esta enfermedad» al estar en contacto con este tipo de enfermos.^{3,21,37}

La tuberculosis es un problema que lejos de tener una solución se encuentra presente sobre todo en países de escasos recursos económicos, ya que «el ritmo con el que se avanza para su eliminación es demasiado lento».^{21,36,40-43} Alrededor de un tercio de la población mundial, equivalente a cerca de dos mil millones de personas, están infectadas con *M. tuberculosis*. De acuerdo con reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2013 se estimó que 9.4 millones de personas desarrollaron tuberculosis, con un rango de 8.6 a 9.4 millones, lo que equivale a 126 casos/100,000 habitantes. De los cuales 1.5 millones murieron y 360,000 eran VIH positivos. En 2014 se calcularon 9.6 millones de nuevos casos de tuberculosis, de los que 5.4 millones eran hombres, 3.2 millones eran mujeres y un millón, niños. Se le considera la segunda causa de muerte por procesos infecciosos después del VIH.^{11,40-43} Desde el punto de vista geográfico de los 9.4 millones que desarrollaron tuberculosis en 2013, los continentes con las cifras más altas fueron Asia (56%) y África (29%), el sobrante 15% está distribuido en el resto del planeta¹¹ con mayor incidencia en el área urbana con respecto a la rural. La sintomatología de la tuberculosis primaria presente en niños pequeños se considera inespecífica, sus síntomas característicos son tos seca, irritativa y expectoración persistentes por más de dos semanas, a estas personas se les refiere como sintomáticos respiratorios (SR).⁷ Los datos encontrados durante la exploración física son igualmente inespecíficos y poco significativos en las formas leves y moderadas y no existen en estadios de exposición y en tuberculosis latente.¹² La literatura reporta poca frecuencia de eritema nodoso o conjuntivitis flictenular como únicos signos en niños recién infectados con *M. tuberculosis* (*Guidance for National Tuberculosis*

Programmes on the Management of Tuberculosis in Children).^{7,13} Ante tal situación la información disponible del paciente pediátrico es limitada, por tal motivo éste es olvidado, por su naturaleza no infecciosa se le excluye de los programas o se le considera sin riesgo para la salud pública.¹⁴ En Estocolmo, Suecia se reconoció en 2011 la ausencia de prioridad en los programas nacionales de control de tuberculosis en niños.⁴⁴

Aun cuando se cuenta con técnicas de diagnóstico y tratamiento, es difícil en el niño, en pacientes paucibacilares y asintomáticos,^{8,14-16,31} si se compara con el de cualquier otra infección de etiología bacteriana, incluso en pacientes altamente bacilíferos (50-80%).⁴²

La baciloscopia es la técnica de elección para el diagnóstico rápido y el control de tuberculosis pulmonar en adultos. Es simple, económica y eficiente para detectar casos infecciosos altamente bacilíferos. Se le considera herramienta fundamental en programas de control de tuberculosis. Las normas de los Programas Nacionales de Control de Tuberculosis (PNCT) recomiendan la obtención de dos o tres muestras por SR para que la probabilidad de detección de BAAR sea máxima. Determinada en aquellos pacientes que no saben expectorar el lavado gástrico como técnica de elección en casos de sospecha de tuberculosis.^{3,45-49}

En el caso de la baciloscopia de muestras provenientes del aparato respiratorio de pacientes pediátricos, la positividad va de 0 a 42%.^{3,45-49} En nuestro estudio, el porcentaje de positividad fue el más bajo de los procedimientos empleados (13.4%), dato que nos confirma lo que en otros países se reveló con anterioridad, menos de 15% en niños con TB.¹²

En la literatura se documenta que el diagnóstico definitivo de tuberculosis se hace con base en cultivo positivo, considerado el estándar de oro,⁵⁰ siendo junto con la baciloscopia y la radiografía de tórax la piedra angular en el diagnóstico de tuberculosis pediátrica.^{8,50} Sin embargo, su recuperación no sólo depende de la calidad de la muestra, sino también de la calidad de la técnica de digestión y descontaminación que se aplique.^{10,50} Los reportes de diferentes investigadores sobre el cultivo refieren una sensibilidad que fluctúa entre 80 y 90% en muestras de adultos altamente bacilíferos, en tanto que en el paciente pediátrico con escasos BAAR la variable es de < 12-50%.^{3,45,47,51,52} En un intento por incrementar la sensibilidad del cultivo y reducir el tiempo de incubación de *M. tuberculosis* se ha recomendado el empleo simultáneo de cultivos en medios líquidos y sólidos. Los resultados obtenidos fueron de 44% empleando ambos tipos de medios (Lowenstein Jensen y Middlebrock).^{30,31,47,53-57}

Ante el vertiginoso desarrollo de la biotecnología se ha introducido una serie de herramientas en la identificación de especies y complejos para determinar la sensibilidad a antimicrobianos y hacer los estudios epidemiológicos de tuberculosis,^{15,19,27,33,42,46-50} entre los cuales la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha propiciado el desarrollo de nuevas metodologías.^{15,23,29-32,36,45}

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos de tipo comercial tienen en general menor sensibilidad en las muestras provenientes de pacientes con procesos clínicos y radiológicamente menos graves, así como en las muestras extrapulmonares y paucibacilares.²⁹

El uso de la PCR junto con la tinción de Ziehl-Neelsen en muestras de esputo o lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con TB pulmonar ha permitido hacer un diagnóstico rápido en 90% de los casos.⁷ Se ha documentado que la aplicación de la PCR en muestras del tracto respiratorio, esputo, lavado broncoalveolar, aspirado de moco en jugo gástrico y aspirado traqueal con examen directo negativo (baciloscopia) tiene una sensibilidad de 76%, especificidad de 97%, valor predictivo positivo (VPP) de 96% y valor predictivo negativo (VPN) de sólo 80%. La seguridad diagnóstica ha sido mayor en las pruebas hechas a partir de secreciones bronquiales y menor en las de jugo gástrico; no obstante, se observaron amplias variaciones entre los diferentes estudios analizados. Razón por la que se ha sugerido no utilizar las pruebas de PCR como método único de diagnóstico en pacientes con TB pulmonar y baciloscopia negativa.¹³ Los resultados obtenidos con el empleo de la PCR y el uso de la IS6110 fue de 47/82, o sea de 57% a partir de las muestras clínicas a las que simultáneamente se les practicó tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo.

El estudio retrospectivo de los 82 pacientes a través de sus datos clínicos y de gabinete (*figura 5*) reveló una relación en 49 de ellos con personas con tuberculosis, lo que equivale a 60% con combe positivo. La aplicación de la reacción intradermo a la tuberculina fue positiva en 24/82 (29%). Esta falta de respuesta ha sido puesta de manifiesto por diferentes investigadores, lo que explica la definición de tuberculosis como un fenómeno complejo entre la relación del hospedero por medio de su respuesta inmunitaria y el agente causal (*M. tuberculosis*). Tomando en cuenta el número de pacientes en quienes se constató la aplicación de la vacuna (BCG) fue 67/82 (82%). De los datos de la histopatología en 65 pacientes, 37 (57%) fueron compatibles con tuberculosis y en 28 de 45 pacientes (62%) se encontraron evidencias de tuberculosis en las placas radiográficas. Con estos datos y los obtenidos a través de pruebas de laboratorio se confirmó el diagnóstico de tuberculosis en los pacientes estudiados.

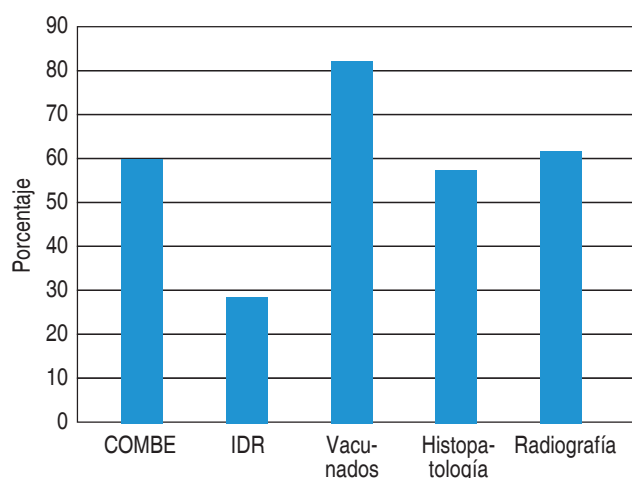


Figura 5. Datos de laboratorio y gabinete encontrados en los pacientes estudiados.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo concluimos que de las tres pruebas aplicadas en bacteriología en la detección de *M. tuberculosis*, la baciloscopia fue la menos sensible como ha sido referido ampliamente en la literatura. El empleo de los dos medios de cultivo favoreció la detección de esta bacteria en un porcentaje ligeramente superior al reportado por otros autores. En tanto que la PCR aplicada tanto a muestras clínicas como a los productos del cultivo nos permitió obtener el resultado más alto y con mayor rapidez que el observado en las dos pruebas realizadas anteriormente. Sin embargo, el diagnóstico de tuberculosis se llevó a cabo con la ayuda de otros parámetros obtenidos por la clínica y estudios de gabinete.

Agradecimientos

Agradecemos a los Doctores Yolanda López Vidal y Gonzalo Castillo Rojas, del Laboratorio de Inmunología de Patógenos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. The Global Plan to Stop TB 2011-2015. Transforming the fight towards elimination to tuberculosis. World Health Organization. 2010. ISBN 978 924 1500340.
2. Global tuberculosis control 2010. Geneve 2010 (WHO/HTM/TB/2010.7)
3. Starke JR. Transmission de *Mycobacterium tuberculosis* to and from children and adolescents. Semin Pediatr Infect Dis. 2001; 12: 115-123.

4. Global tuberculosis report 2012. World Health Organization 2012.
5. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle. 1991; 72: 1-6.
6. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía técnica. Organización Mundial de la Salud. Primera parte, 2008.
7. Farga V. Tuberculosis. Segunda edición. Publicaciones técnicas Mediterráneo. Santiago de Chile. 2012.
8. Mukherjee A, Lodha R, Kabra SK. Changing trends in childhood tuberculosis. Indian J Pediatr. 2011; 78 (3): 328-333. doi: 10.1007/s12098-010-0298-4
9. Zumla A. Algunas acciones factibles contra la tuberculosis. BMJ. Edición Latinoamericana. 1999; 7: 151-152.
10. Cernoch PL, Enns PK, Saubolle MA, Wallace Jr RL. Laboratory diagnosis of the Mycobacterioses. CUMITECH 16. ASM Press. 1994.
11. Global Tuberculosis Report 2014. World Health Organization 2014.
12. Moreno PD, Martín AA, Gómez NA, Baquero-Artigao F, Escribano Montaner KF, Gómez-Pastrana DI et al. Diagnóstico de la tuberculosis en la edad pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) Y la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SENP) An Pediatr (Barc). 2010; 73: 143e1-143e14.
13. Guidance for national TB programmes of tuberculosis in childrens. WHO ATM/TB/2006.71
14. Singh V. Diagnosis of childhood tuberculosis-the road so far and the way ahead. Pediatric Infectious Disease. 2010; 2 (3): 119-122.
15. Oberhelman R, Soto-Castellares G, Gilman RH, Caviedes L, Castillo ME, Kolevic E et al. Diagnostic approaches for paediatric tuberculosis by use of different specimen types, culture methods, and PCR a prospective case-control study. Lancet Infect Dis. 2010; 10: 612-620.
16. Lighter J, Rigaud M. Diagnosing childhood tuberculosis. Curr Peobl Pediatr Adolesc Health Care. 2009; 39: 61-88.
17. Chin PD, Crane CM, Diul MY, Sun SJ, Agraz R, Taylor S et al. Spread of *Mycobacterium tuberculosis* in a community implementing recommended elements of tuberculosis control. JAMA. 2000; 283: 2968-2974.
18. Sang-Nae Cho. Tuberculosis: diagnostics. Tuberculosis. 2007; 87: S14-S17.
19. García de Lomas J, Navarro D. New directions in diagnostics. Pediatric Infect Dis J. 1997; 16 (3 Suppl): S43-48.
20. Borroughs M, Beitela A, Kawamura A, Revai K, Ricafort R, Chiu K et al. Clinical presentation of tuberculosis in culture-positive children. Pediatric Infect Dis. 1999; 18 (5): 440-446.
21. Iselman LS. Tuberculosis in children: un update. Pediatric pulmonary. 1996; 21: 201-220.
22. Abadco DL, Steiner P. Gastric lavage is better than bronchoalveolar lavage for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood pulmonary tuberculosis. Pediatr Infect Dis. 1992. 11: 735-738.
23. Pai M, Minion J, Sohn H, Zwerling A, Perkins MD. Novel and improved technologies for tuberculosis diagnosis: progress and challenges. Clin Chest Med. 2009; 30:701-716.
24. Blancarte ML, Anzaldo de JG y Balandrano de ES. Manual de técnicas y procedimientos de laboratorio en tuberculosis. Publicación técnica del INDRE. 1992. No. 20, México, D.F.
25. Castillo VA. Valor diagnóstico de los criterios de Stegen modificado por Toledo en la tuberculosis infantil en el Hospital Nacional Guillermo Almeria Irigoyen. Revista Peruana de Pediatría. 2005; 58: 30-39.
26. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica II Parte. Organización Panamericana de la Salud. 2008.

27. Palacios JJ, Ferro J, Telentin M, Roces SG, Prendes P, García JM et al. Comparison of solid and liquid cultura media with the polimerasa chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Dis*. 1996; 15: 478-483.
28. Wilson MD. Rapid Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection and drug susceptibility testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137: 812-819.
29. Pai M, Kalanteri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006; 6: 423-432.
30. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of *Mycobacteria*. *Clin Chem*. 2001; 45: 809-814.
31. García GR, Lara HA, Nájera GMC, Arzate BP. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en niños, con empleo de dos sistemas de cultivo y su confirmación con la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Enf Infec en Pediatría*. 1999; XII: 323-328.
32. Díaz ML, Herrera T, López VY, Calva JJ, Hernández R, Ruíz PG et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in tissue and assesment of its utility in the diagnosis of hepatic granulomas. *J Lab Clin Med*. 1996; 127: 359-363.
33. Thierry D, Cave MD, Eisenach K, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B et al. IS6110, as IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 188.
34. Sambrook J, Fritsc EF and Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory Manual Vol. 3, Second Edition. Cold Spring Harbor laboratory. Pres. New York, 1989.
35. Smith KC, Starke JR, Eisenach K, Org LT and Denby M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using Polimerase chain reaction. *Pediatric*. 1996; 97: 155-160.
36. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis*. 1999; 144: 1160-1163
37. Fisker C y Hass D. Micobacteria: Tuberculosis y lepra. En 5ª edición Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Engleberg NC, DiRita V, Dermody T (ed). Editorial Wolter Kluwer/Lipeincot Wilkins. Baltimore. 2013. pp. 257-268.
38. Yates TY, Khan PY, Knight GM, Taylor JG, McHugh TD, Lipman M, Moore DA. The transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in high burden setting. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16: 227-238. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00499-5.
39. Tarago A, Jiménez S, Sánchez A, Arroyo A, Aracil J y cols. Brote de tuberculosis en un colegio de primaria: descripción y consideraciones sobre el valor del jugo gástrico en el manejo de microepidemias. *Enferm Infecc Clin*. 2011; 29: 90-95.
40. Cruz Anleu ID, Velásquez Serrato JR. Tuberculosis infantil. ¿Cómo diagnosticarla? *Arch Argent Pediatr*. 2012; 110: 144-151.
41. Murthy S, Keystone J, Kissoon N. Infections of the developing world. *Crit Care Lin*. 2013; 29: 485-507.
42. Sudre P, Ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull World Health Organ*. 1992; 70: 149-159.
43. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG. The growing burden of tuberculosis. *Arch Intern Med*. 2003; 163: 1009-1021.
44. Ghanashyam B. Childhood tuberculosis-the time for action is NOW. *Pediatric Infectious Disease*. 2012; 4: 94-95.
45. Gómez PD, Torrenteras R, Caro P, Anguita ML, Barrio AML, Andrés A et al. Diagnosis of tuberculosis in children using a polymerase chain reaction. *Pediatric Pulmonology*. 1999; 28: 344-351.
46. Montenegro SH, Gilman RH, Sheen P, Cama R, Caviedes L, Hopper T et al. Improved Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian Children by Use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 16-23.
47. Merino JM, Álvarez T, Marrero M, Ansó S, Elvira A, Iglesias G et al. Microbiology pediatric primary pulmonary tuberculosis. *CHEST Journal*. 2001; 119: 1434-1438.
48. Baghaei P, Tabarsi P, Farnia P, Radaei AH, Kazempour M, Faghani YA et al. Utility of gastric lavage for diagnosis of tuberculosis in patients who are unable to expectorate sputum. *Glob Infect Dis*. 2011; 3:339-343. doi:10.4103/0974-777X.91054
49. Karam BJ. Diagnóstico y tratamiento de tuberculosis durante la infancia. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. 1994; 1: 117-124.
50. Chakravorty S, Dudeja M, Hanif M, Tyagi JS. Utility of universal samples processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 2703-2708.
51. Jacob JT, Mehta AK, Leonard MK. Acute forms of tuberculosis in adults. *Am J Med*. 2009; 122: 12-17.
52. Lincon EM, Harris LC. Endobronchial tuberculosis in children, a study of 156 patients. *Am Rev Tuber*. 1958; 77: 39-61.
53. Berean K, Roberts FJ. The reliability of acid fast stained smears of gastric aspirate specimens. *Tubercle*. 1988; 69: 205-208.
54. Magee J, Freeman R, Barrett A, Attrill H, Lightfoot NF. Testing for tuberculosis. *The Lancet*. 1996; 347: 476.
55. Venkataraman B, Vasudevan M, Grupta A. A new microarray platform for whole-genome expression profiling of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiological Methods*. 2014; 97: 34-43.
56. Benjamin WH, White KB, Moser SA. The MB/BacT is a sensitive method of gastric aspirate specimens in laboratory with a low rate of isolation. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3133-3134.
57. Benson CA. *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex Disease. In: Schlossberg D (Ed). *Tuberculosis and nontuberculosis mycobacterial infectious*. WB. Saunders Company. 4th Edition. Philadelphia Pennsylvania. 1999. 351-371.