ALTERNATIVAS ACTUALES PARA LA CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA DE TUBERCULOSIS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

Current alternatives for diagnostic confirmation of pediatric tuberculosis

Dr. Rafael Laniado-Laborín

Maestro en Salud Pública

Clínica y Laboratorio de Tuberculosis, Hospital General Tijuana

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California

Comité Luz Verde, Organización Panamericana de la Salud

Sistema Nacional de Investigadores, CONACYT, México

CURRENT ALTERNATIVES FOR DIAGNOSTIC CONFIRMATION OF PEDIATRIC TUBERCULOSIS

Every year, more than half a million of children develop tuberculosis worldwide, representing 7% of all tuberculosis cases. The biggest diagnostic obstacle in pediatric tuberculosis is microbiology confirmation. Clinical diagnosis in children is unreliable because signs and symptoms lack specificity. Several diagnostic alternatives have been developed in the past two decades, including light-emitting diodes (LED) microscopy which is more sensitive and faster than conventional microscopy, automated liquid culture methods that have increased the yield and shorten turn around report times, and finally the molecular biology assays, like the Xpert MTB/RIF, a fully automated polymerase chain reaction system that can identify *M. tuberculosis* complex and resistance to rifampicin in about 2 hours, and the GenoType assay that can identify *M. tuberculosis* complex and detect resistance to rifampicin and isoniazid in less than 24 hours.

Key words: tuberculosis, children, laboratory diagnosis, microscopy, polymerase chain reaction, drug resistance

RESUMEN

Anualmente más de medio millón de niños desarrolla tuberculosis, representando el 7% de todos los casos a nivel mundial. La dificultad en la confirmación diagnóstica constituye el principal reto en el paciente pediátrico. El diagnóstico clínico en niños es complejo, ya que los signos y síntomas son poco sensibles y específicos. En la últimas dos décadas se han desarrollado alternativas para diagnóstico, entre las que se incluyen la microscopía LED, más sensible que la microscopía convencional, los sistemas de cultivo líquido automatizados que han mejorado el rendimiento y reducido los tiempos para reporte y los métodos moleculares, en donde destacan el Xpert MTB/RIF, sistema automatizado de reacción en cadena de la polimerasa que puede detectar el *Mycobacterium tuberculosis* y simultáneamente la resistencia a rifampicina en solo dos horas, así como el ensayo GenoType, que permite la identificación y detección de resistencia a isoniazida y rifampicina en menos de un día.

Palabras clave: tuberculosis, niños, prueba de laboratorio, microscopía, reacción en cadena de la polimerasa, resistencia a medicamentos.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a las estimaciones más recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente a nivel mundial, más de medio millón de niños desarrolla tuberculosis (TB), representando el 7% de todos los casos de TB (1). De ellos se estima, que casi 32.000 casos (IC95% 25.594–38.663) son causados por cepas multifármacoresistentes (TB-MFR) (2).

La dificultad prevalente hasta la fecha en la confirmación del diagnóstico de TB constituye el principal reto en el manejo del paciente pediátrico en quien se sospecha la enfermedad. El diagnóstico clínico de la TB pediátrica es complejo debido a que los signos y síntomas son poco sensibles y específicos (3). Esta dificultad se magnifica en los niños co-infectados con el virus

de la inmunodeficiencia humana (VIH), en quienes el diagnóstico diferencial incluye múltiples patologías que simulan a la TB (4). La radiología torácica, que se ha utilizado tradicionalmente como un elemento clave en el diagnóstico de la TB, muestra una pobre correlación intra e interobservador en la interpretación, dadas las diferencias en la severidad de la enfermedad y en el estado inmunológico del hospedero (5).

La necesidad de confirmar el diagnóstico es particularmente importante en esta era de TB resistente a los fármacos (TB-FR). El diagnóstico de TB-FR requiere forzosamente la obtención de un espécimen adecuado para cultivo o análisis por métodos de biología molecular. En áreas con tasas elevadas de TB-MFR, la información sobre la presencia de cepas resistentes es fundamental para la administración segura del esquema primario.

Los métodos de laboratorio convencionales han tenido tradicionalmente muy bajo rendimiento en el paciente pediátrico, dada la naturaleza paucibacilar de la TB en niños y la dificultad para obtener muestras adecuadas de expectoración. En niños, la baciloscopia es positiva en solo el 10 al 15% de los casos y los cultivos en un 10-25% (4). Frecuentemente además, en

Correspondencia:

Dr Rafael Laniado-Laborín

Hospital General Tijuana, Av. Centenario 1085

Zona Rio Tijuana, Baja California - México CP 22320

Correo electrónico: rlaniano@uabc.edu.mx

las áreas endémicas con mayor carga de TB, no existe acceso a cultivos, y cuando están disponibles, los resultados se retrasan tanto que rara vez son útiles para el manejo clínico del caso. Esto es particularmente importante en el paciente pediátrico, dado el riesgo de progresión y diseminación rápida de la enfermedad.

A continuación, describimos algunas de las estrategias y alternativas que existen actualmente para confirmación del diagnóstico de TB y su rendimiento en pacientes pediátricos.

¿QUÉ TIPO DE MUESTRA ES LA MÁS APROPIADA PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB PEDIÁTRICA?

Tradicionalmente el aspirado gástrico después de una noche de ayuno se ha considerado el método de elección en infantes ante la sospecha de tuberculosis. Sin embargo, esto implica contar con el equipo y personal capacitado para realizar este procedimiento invasivo, lo que dificulta su realización en aquellos sitios donde la carga de tuberculosis es mayor. Otros métodos menos invasivos, incluyendo la inducción de la expectoración y la aspiración nasofaríngea ya han sido evaluados y los resultados sugieren que ambos ofrecen la misma sensibilidad que el aspirado gástrico (6, 7).

Los hemocultivos y urocultivos pudieran tener utilidad en pacientes pediátricos con VIH (5). El ultrasonido para guiar la aspiración con aguja en pacientes con adenopatías cervicales, puede aumentar el rendimiento y la seguridad del procedimiento (8). En el derrame pleural, el estudio del líquido mediante métodos fenotípicos y moleculares tiene muy baja sensibilidad; la biopsia pleural toracoscópica, procedimiento invasivo pero de muy bajo riesgo, ha demostrado una aceptable sensibilidad (9).

MICROSCOPÍA DE EXPECTORACIÓN MEDIANTE FLUORESCENCIA LED

La microscopía de luz convencional con la tinción de Ziehl-Nielsen (ZN) es el método diagnóstico más frecuentemente disponible en regiones con recursos limitados, y si bien es altamente específica, su sensibilidad es muy variable (20-80%), y muy baja en pacientes con TB extrapulmonar o co-infectados con VIH.

La microscopía LED (mediante diodos emisores de luz, o LED por las siglas en inglés) ofrece los beneficios de la microscopía fluorescente, sin los inconvenientes de la microscopía convencional por fluorescencia; de hecho, la OMS ha recomendado que la microscopía convencional de ZN sea remplazada por la microscopía LED (10).

La microscopía LED es 10% más sensible que la microscopía de ZN y la revisión de las laminillas es más rápida (aproximadamente la mitad del tiempo requerido para leer una laminilla ZN); además los microscopios LED son más baratos que los microscopios para fluorescencia convencional, la fuente de luz es más duradera, no presentan el riesgo potencial de emanar vapores de mercurio al romperse las lámparas y no requieren de un cuarto oscuro. Estas ventajas han sido demostradas ya el campo en regiones de alta carga de TB, como se reportó recientemente en la India (11).

CULTIVOS PARA MICOBACTERIAS Y MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA DETERMINAR SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSIS

Como se mencionó, la sensibilidad de los cultivos en medio sólido es baja y los resultados de las pruebas de sensibilidad a los fármacos (PSF) antituberculosis se puede llevar de 8 a 12 semanas. Los sistemas de cultivos líquidos automatizados como el Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) 960 system® (Becton-Dickinson, Sparks, MD) han mejorado el rendimiento y reducido los tiempos para reportar resultados de las PSF. Sin embargo en niños, cuyas muestras son generalmente paucibacilares, los resultados, aun con estos sistemas automatizados, pueden retrasarse hasta 6-8 semanas. Además, estos sistemas son costosos y requieren laboratorios con niveles de bioseguridad 3 y personal altamente capacitado (12). La identificación del complejo *M. tuberculosis* con este sistema se ha facilitado al contarse ahora con pruebas rápidas de cromatografía lateral tales como el ensayo MGIT TBc Identification Test® (TBc ID, Becton Dickinson) y el Capilia TB® (TAUNS, Numazu, Japón) que permiten la identificación a partir del cultivo líquido en 15 minutos.

Existen métodos de cultivo y PSF aun más rápidos como el MODS (Microscopic Observed Drug-Susceptibility), desarrollado y ampliamente implementado en el Perú, que permite obtener resultados de PSF en 7-14 días; sin embargo se utiliza poco fuera de este país (13).

MÉTODOS GENOTÍPICOS PARA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD: XPERT MTB/RIF

El sistema Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA) es un ensayo automatizado de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) que puede detectar el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y simultáneamente la resistencia a rifampicina en solo dos horas (14). A diferencia de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos convencionales, el procesamiento de la muestra en este sistema, incluyendo la extracción de los ácidos nucleicos, la amplificación por PCR y la detección se encuentran totalmente integradas en un cartucho. Una vez que a la muestra se le añade un reactivo bactericida que licua el espécimen, y esta se carga, todos los pasos del ensayo son automatizados y contenidos dentro del cartucho.

Esta automatización asegura un riesgo de bioseguridad prácticamente nulo, y además permite que la prueba la lleve a cabo personal técnico con mínimo entrenamiento y en el punto de contacto con el paciente (15) ya que estudios han confirmado que no ocurre aerolización de micobacterias durante el procesamiento de la muestra (16).

El Xpert MTB/RIF utiliza tecnología de sondas para PCR en tiempo real que reconocen y reportan la presencia o ausencia de la secuencia de susceptibilidad a la rifampicina del gen *rpoB* del *M. tuberculosis* (15). La especificidad del ensayo, demostrada al probar diversos tipos de micobacterias no tuberculosas, hongos y virus, muestra que el sistema excluye virtualmente todos los aislados no tuberculosos (15).

Se ha demostrado en adultos que una prueba del Xpert en una muestra única, detecta el 92.2% de todos los pacientes con

cultivo positivo. En pacientes con baciloscopía y cultivo positivo la sensibilidad asciende a 99%. En pacientes con baciloscopía negativa y cultivo positivo una prueba de Xpert detecta al 72.5% de los casos. La especificidad es excelente, reportándose en 99% (IC95% 98-99%) (14). En adultos co-infectados con VIH, la sensibilidad del Xpert es de 93.9% y la especificidad de 99%.

Para la detección de resistencia a rifampicina, la sensibilidad global es de 95% (IC95% 90-97%) y la especificidad es de 98% (IC95% 97-99%). El valor predictivo negativo (VPN) para resistencia a rifampicina es de 98.9%, esto es, un resultado negativo virtualmente excluye la resistencia a rifampicina. La tasa

de resultados indeterminados es de 3.7%, menor que la tasa de contaminación del cultivo.

Los tiempos requeridos para detección de *M. tuberculosis* son menos de 1 día para el Xpert MTB/RIF, 17 días para el cultivo líquido y más de 30 días para el cultivo sólido. La detección de resistencia a rifampicina es menor de 1 día con el Xpert MTB/RIF vs. 75 días con los métodos fenotípicos convencionales (15).

Los resultados del Xpert en muestras no respiratorias se resumen en la Tabla 1.

TIPO DE MUESTRA	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
Aspirado de ganglios	84.9	92.5
Líquido cefalorraquídeo	79.5	98.6
Líquido pleural	43.7	98.1
Aspirado gástrico	83.3	98.1

Tabla 1. Rendimiento del sistema Xpert RIF/MTB en muestras no respiratorias (vs resultados de cultivo como estándar de oro).

Para líquido pleural, si se compara contra el estándar compuesto de referencia (histología, baciloscopía/cultivo del líquido, pruebas bioquímicas, respuesta al tratamiento) la sensibilidad es solo de 17% (8-34%) y la especificidad 99.9% (94-100%) por lo que el líquido pleural no se considera como un espécimen adecuado para el diagnóstico de TB pleural por esta técnica, siendo la biopsia pleural la muestra preferida para el diagnóstico.

La información sobre otro tipo de especímenes (como líquido de ascitis, líquido pericárdico, orina, sangre y heces) es muy limitada y por lo tanto no se puede emitir una recomendación.

EL XPERT MTB/RIF PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TB PULMONAR Y LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA EN NIÑOS

La sensibilidad global del Xpert MTB/RIF (basada en información de 10 estudios clínicos) vs el cultivo como estándar de oro, en muestras de expectoración espontánea o inducida en niños con sospecha de TB pulmonar es de 66% (IC95% 52-77%) y también de 66% (IC95% 51-81%) para el aspirado gástrico, por lo que dependiendo de la edad del paciente se puede elegir el tipo de muestra. En ambos casos la especificidad es de 98% con intervalo de confianza muy estrecho.

La sensibilidad del Xpert para detectar resistencia a rifampicina en niños se ha reportado en 86% (IC95% 53-98%)(14)

RECOMENDACIONES DE LA OMS PARA EL USO DEL XPERT MTB/RIF EN NIÑOS

1. Debe utilizarse en vez de la microscopía, el cultivo y las PSF como prueba inicial en niños en quienes se sospecha TB-MFR o TB asociada a VIH (recomendación sólida, muy pobre calidad de la evidencia)
2. Debe utilizarse en vez de la microscopía y cultivo como prueba inicial en todos los niños en quienes se sospecha TB (recomendación condicional a la disponibilidad de recursos, muy pobre calidad de la evidencia)
3. Debe utilizarse como prueba inicial en líquido cefalorraquídeo en pacientes con sospecha de TB meníngea (recomendación sólida dada la urgencia para el diagnóstico, muy pobre calidad de la evidencia)
4. Puede utilizarse para analizar especímenes no respiratorios específicos (aspirado de ganglios linfáticos y otros tejidos) en pacientes con sospecha de TB extrapulmonar (recomendación condicional, muy pobre calidad de la evidencia) (14, 15).

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS Y RESISTENCIA A ISONIACIDA Y RIFAMPICINA MEDIANTE EL SISTEMA GENOTYPE

El GenoType®MTBDRplus assay (Hain Lifescience, Nehren, Germany) es un ensayo de laboratorio que tiene como blanco los genes *rpoB*, *katG* e *inhA*, detectando no solo el complejo *Mycobacterium tuberculosis* si no también simultáneamente la susceptibilidad a rifampicina e isoniacida. La versión 2 del GenoType tiene virtualmente la misma sensibilidad y especificidad del Xpert MTB/RIF en muestras respiratorias, pero sus resultados tardan un poco más (<8 hrs) y requiere de un laboratorio de biología molecular y personal capacitado (16). La enorme ventaja del GenoType es que permite diagnosticar TB-MFR en menos de 24 horas y no solo resistencia a rifampicina (en vez de semanas o hasta meses que se requieren con los métodos fenotípicos).

Se ha utilizado el GenoType en líquido cefalorraquídeo, y utilizando el cultivo líquido como estándar de oro (MGIT 960); el GenoType detecta al complejo de *M. tuberculosis* en el 55% de los casos demostrados bacteriológicamente y tiene una sensibilidad para detectar resistencia a isoniacida de 93% con especificidad de 97% y para rifampicina una sensibilidad de 80% con especificidad de 98.8% (17).

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN LATENTE MEDIANTE ENSAYOS DE LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA

Los niños menores de 5 años portadores de infección tuberculosa latente no tratados con terapia preventiva tienen un riesgo desproporcionadamente alto de progresar a enfermedad activa. Aquellos que además están infectados con VIH, presentan un riesgo 24 veces mayor de desarrollar la enfermedad en comparación con los niños seronegativos (18).

La prueba cutánea de tuberculina (PCT), constituyó por décadas el único método disponible clínicamente para diagnosticar la infección tuberculosa latente. A pesar de ello, la prueba dista mucho de ser un método ideal dadas sus limitaciones: dificultades en la técnica de aplicación e interpretación y pobre especificidad por resultados falsos positivos debido a reacción cruzada con los antígenos del *Mycobacterium bovis*-BCG, presentes en la vacuna de Calmette-Guérin (BCG) y por reacción cruzada con los antígenos de múltiples micobacterias no tuberculosas.

Los ensayos de liberación de interferón- γ , conocidos como IGRAs (por sus siglas en inglés, Interferon Gamma Release Assays) son pruebas sanguíneas que miden la liberación de interferón- γ por los linfocitos-T CD4+ cuando son estimulados con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Debido que estos antígenos no se encuentran en *M. bovis*-BCG ni en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas (MNT) los IGRAs son más específicos que la PCT y por ello generan un menor número de falsos positivos.

Sin embargo los IGRAs prácticamente no ofrecen ninguna ventaja sobre la PCT en sensibilidad, y tanto los IGRAs como la PCT tienen una menor sensibilidad en niños inmunocomprometidos.

Desafortunadamente ni los IGRAs ni la PCT permiten distinguir entre infección latente y enfermedad tuberculosa activa.

Se cuenta con dos tipos de IGRAs disponibles

comercialmente: el Quantiferon-TB Gold in tube (QFT®; Cellestis/Qiagen, Carnegie, Australia) y el T-SPOT.TB (T-SPOT®; Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom). Ambos ensayos incluyen el antígeno de secreción temprana 6 (ESAT-6) y la proteína de filtrado de cultivo (CFP-10). El QFT además incluye un tercer antígeno, el TB7.7. Los genes que codifican estos antígenos no se encuentran presentes en el genoma de *M. bovis*-BCG (aunque si en *M. bovis* "salvaje") y en la mayoría de las MNT (especialmente en el complejo *M. avium*, la MNT patogénica encontrada clínicamente con mayor frecuencia). Estos antígenos si se encuentran presentes en algunas MNT, incluyendo *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. zulgai* y *M. flavescens*.

El ensayo de QFT es un ensayo de ELISA, reportándose el resultado de interferón- γ en UI/mL. La prueba se considera positiva cuando la respuesta de interferón- γ a los antígenos de la TB se encuentra por encima del punto de corte de 0.35 UI/mL. El ensayo de T-SPOT utiliza la técnica de ELISPOT en células mononucleares de sangre periférica que han sido incubadas con los dos antígenos. El resultado se reporta como el número de células T productoras de interferón- γ (SPOT-forming cells). Se considera positivo cuando el número de células SPOT en la muestra (después de restarle el número de células SPOT en el control negativo), excede un umbral predeterminado (usualmente 8 células SPOT). Los diversos meta-análisis han mostrado que las diferencias entre el QFT y el T-SPOT son mínimas. Estos han mostrado una especificidad entre 95 y 100% que no se ve afectada por el antecedente de vacunación con BCG. La especificidad de la PCT es similar a la de los IGRAs en sujetos no vacunados con BCG, pero es solo de 60% en poblaciones inmunizadas con esta vacuna. La sensibilidad de las IGRAs en adultos con TB bacteriológicamente confirmada (prueba absoluta de infección) es de 80-90% vs. 80% para la PCT. Ambos tipos de prueba son menos sensibles en pacientes co-infectados con VIH.

Los resultados inválidos en niños se han reportado entre 0-10%; las tasas parecen ser más altas en lactantes e infantes que en escolares o adolescentes.

Existe cierta desconfianza no fundamentada en utilizar los IGRAs en niños menores de 5 años. Estudios recientes han demostrado buenos resultados de los IGRAs comercialmente disponibles en niños pequeños, y no existe evidencia de que la edad afecte los resultados del QFT (19). En un estudio en pacientes pediátricos (una tercera parte de ellos menores de 2 años), los niños menores de dos años produjeron un título medio de interferón- γ mayor que el de los adolescentes (20).

El hallazgo más sólido y consistente en niños es que los IGRAs son más específicos que la PCT en niños inmunizados con BCG. En esta población la especificidad del QFT es de 100%, 90% para el T-SPOT y 56% para la PCT. A pesar de su mayor especificidad, la decisión de tratar o no a un niño con PCT positiva e IGRA negativa se basará en el juicio clínico, tomando en cuenta la edad del paciente, la estratificación de riesgo y el grado de exposición.

Está claro que el uso de la PCT en niños menores de 2 años que han sido vacunados con BCG se asociará a algunos resultados falsos positivos por reacción cruzada con la BCG.

Se puede concluir, que si se realiza una prueba de IGRA en un niño y resulta positiva, esto indica la presencia de infección con *M. tuberculosis*, pero una prueba negativa no la descarta.

Los contactos de un caso activo de tuberculosis con

una prueba negativa (ya sea IGRA o PCT) deben someterse a una segunda prueba a las 8-10 semanas para detectar a aquellos sujetos que se encontraban en periodo de ventana cuando se realizó la prueba inicial (21).

CONCLUSIONES

El bajo rendimiento de los métodos diagnósticos tradicionales ha llevado a la práctica de tratar la TB pediátrica en forma empírica con demasiada frecuencia. Si bien es cierto que en algunos casos, ni aun aplicando los métodos aquí referidos se podrá confirmar bacteriológicamente la enfermedad, es necesario en todos los casos de sospecha intentar obtener esta confirmación, especialmente en regiones con prevalencia elevada de resistencia a los fármacos antituberculosis. Los programas nacionales a cargo del control de la tuberculosis tienen la obligación y la urgencia de fortalecer sus redes de laboratorio para que estos a su vez puedan ofrecer al clínico estas nuevas opciones para el diagnóstico oportuno de la tuberculosis.

El autor declara no presentar conflicto de intereses

REFERENCIAS

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08. ISBN 978 92 4 156480 9
- Jenkins HE, Tolman AW, Yuen CM, Parr JB, Keshavjee S, Pérez-Vélez CM, Pagano M, Becerra MC, Cohen T. Incidence of multidrug-resistant tuberculosis disease in children: systematic review and global estimates. *Lancet* 2014; 383: 1572-79
- Theron G. Xpert MTB/RIF to diagnose tuberculosis in children. *Xpert MTB/RIF to diagnose tuberculosis in children. Lancet Respir Med.* 2015 Mar 23. pii: S2213-2600(15)00111-3. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00111-3
- Thomas TA, Heysell SK, Moodley P, Montreuil R, Ha X, Friedland G et al. Intensified specimen collection to improve tuberculosis diagnosis in children from Rural South Africa, an observational study. *BMC Infect Dis* 2014; 14:11
- Graham SM, Ahmed T, Amanullah F, Browning R, Cardenas V, Casenghi M et al. 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
- Hatherill M, Hawkridge T, Zar HJ, Whitelaw A, Tameris M, Workman L, Geiter L, Hanekom WA, Hussey G. Induced sputum or gastric lavage for community based diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis? *Arch Dis Child* 2009; 94:195-201
- Qureshi UA, Gupta AK, Mahajan B, Qurieshi MA, Altaf U, Parihar R, Bhau KS: Microbiological diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: comparative study of induced sputum and gastric lavage. *Indian J Pediatr* 2011; 78:1429-1430
- Moseme T, Savvas Andronikou S. Through the eye of the suprasternal notch: point-of-care sonography for tuberculous mediastinal lymphadenopathy in children. *Pediatr Radiol* 2014; 44:681-684
- Keys C, McLeod E, Pesti C, Armstrong D. Thoracoscopic Pleural Biopsy as an Aid to Diagnosis in Pediatric Tuberculosis with Pleural Involvement. *Eur J Pediatr Surg* 2012; 22: 315-317
- World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.8. ISBN 978 92 4 1501613
- Kelly V, Sagili KD, Satyanarayana S, Reza LW, Chadha SS, Wilson NC. Cost-utility analysis of LED fluorescence microscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Indian settings. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19:696-701
- Schaaf HS, Marais BJ. Management of multidrug-resistant tuberculosis in children: a survival guide for paediatricians. *Paediatr Respir Rev* 2011; 12:31-38
- Moore DAJ, Evans CAW, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A et al. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of Tuberculosis. *N Engl J Med* 2006; 355:1539-50
- World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. World Health Organization 2013. WHO/HTM/TB/2013.16. ISBN: 978 92 4 150633 5
- World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. WHO/HTM/TB/2011.4. ISBN 978 92 4 150154 5
- Solomons RS, Visser DH, Friedrich SO, Diacon AH, Hoek KGP, Marais BJ et al. Improved diagnosis of childhood tuberculous meningitis using more than one nucleic acid amplification test. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015; 19:74-8
- Gupta R, Thakur R, Gupta P, Jalan N, Kushwaha S, Gupta M et al. Evaluation of Genotype MDRTBplus line probe assay for early detection of drug resistance in tuberculous meningitis patients in India. *J Global Infect Dis* 2015; 7:5-10
- Mandalakas AM, Detjen AK, Hesselning AC, Benedetti A, Menzies D. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15:1018-1032
- Debord C, De Lauzanne A, Gourguillon N, Guérin-El Khourouj V, Pédrón B, Gaudelus J, Faye A, Sterkers G. Interferon-gamma release assay performance for diagnosing tuberculosis disease in 0- to 5-year-old children. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:995-997
- Critselis E, Amanatidou V, Syridou G, Spyridis NP, Mavrikou M, Papadopoulos NG, Tsolia MN. The effect of age on whole blood interferon- gamma release assay response among children investigated for latent tuberculosis infection. *J Pediatr* 2012; 161:632-638
- Starke JR. Interferon-γ Release Assays for Diagnosis of Tuberculosis Infection and Disease in Children. *Pediatrics* 2014; 314:e1763