



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“TUBERCULOSIS PEDIÁTRICA:
EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE
UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA
MOLECULAR EN MUESTRAS
BUCALES PARA LA DETECCIÓN DE
ADN DE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS Y ASOCIACIÓN ENTRE
LA LACTANCIA MATERNA
EXCLUSIVA Y LA TUBERCULOSIS
ACTIVA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

JUAN ANTONIO FLORES TUMBA

LIMA - PERÚ

2022

Asesora

Dra. Kelika Konda

JURADO DE TESIS

DRA LAURA CATHERINE ALTOBELLI MEIER

PRESIDENTE

DR. ANDRES GUILLERMO LESCANO GUEVARA

VOCAL

DRA. SUMONA DATTA

VOCAL

DR. GERMAN FELIPE ALVARADO CUTIPA FLORES

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mi familia, mi esposa
Cecilia, mi hijo Leonardo y
mi madre Susana por su
constante paciencia, apoyo y
comprensión al trabajo que he
venido realizando, sus
tiempos invertidos han
sumado mucho a la
finalización de este trabajo de
tesis y han sido mis mayores
motivaciones.

AGRADECIMIENTOS

A los equipos tanto de Socios En Salud
Sucursal Perú y a Harvard Medical School
por haberme abierto las puertas para la
culminación de la tesis.

A mi asesora Dra. Kelika Konda y al Mg.
Segundo León por todo el apoyo que recibí
para la ejecución de la tesis y en el
acercamiento a los equipos de investigación
que hicieron posible este trabajo.

A mi mentora Dra. Molly Franke, de quien
recibí apoyo constante y desinteresado para
lograr este objetivo y en quien he encontrado
una amiga y científica admirable.

A todos mis colegas, amigos y alumnos a
quienes agradezco el apoyo, el tiempo, las
dudas y las respuestas oportunas que me
brindaron.

A los participantes del estudio DETECT-
niños

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

FONDECYT/CIENCIACTIVA

Beca de formación EF033-235-2015

National Institutes of

Health under the Center of

Excellence in Translational

Research (CETR) grant U19 AI109755

TUBERCULOSIS PEDIÁTRICA: EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA MOLECULAR EN MUESTRAS BUCALES PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y ASOCIACIÓN ENTRE LA LACTANCIA MATE

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	documentop.com Fuente de Internet	1%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	issuu.com Fuente de Internet	1%
4	www.tandfonline.com Fuente de Internet	<1%
5	idoc.pub Fuente de Internet	<1%
6	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1%
7	biblio.flacsoandes.edu.ec Fuente de Internet	<1%
8	dspace.utb.edu.ec Fuente de Internet	<1%

Tabla de Contenidos

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS GENERAL	6
IV.	INVESTIGACIÓN 1	11
	“Evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en muestras bucales de niños menores de 15 años de edad”	11
3.1	Justificación	11
3.2	Pregunta de Investigación Principal	17
3.3	Hipótesis Secundarias	17
3.4	Materiales y Métodos	17
3.4.1	Diseño	17
3.4.2	Población y diseño muestral	19
3.4.2.1	Población	19
3.4.2.1.1	Criterios de inclusión	19
3.4.2.1.2	Criterios de exclusión	20
3.4.3	Muestreo	21
3.4.3.1	Tipo de muestreo	21
3.4.4	Procedimientos del estudio	22
3.4.4.1	Recolección de datos	22
3.4.4.1.1	Cuestionarios	22
3.4.4.1.2	Muestras biológicas	24
3.4.4.2	Procesamiento de muestras biológicas	28
3.4.5	Variables de estudio	33
3.4.5.1	Variable desenlace (dependiente) y co-variable principal (independiente)	33
3.4.5.2	Otras co-variables relevantes	34
3.4.5.3	Gráfico acíclico dirigido (DAG)	34
3.4.6	Procesamiento y análisis estadístico	35
3.4.7	Cálculo de tamaño de muestra o potencia estadística	36

3.5	Resultados	38
3.5.1	Enrolamiento y muestra de estudio	38
3.5.2	Análisis de sensibilidad y especificidad	43
3.5.3	Análisis binomial	43
3.6	Discusión	50
V.	INVESTIGACIÓN 2: Nivel de asociación entre la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida y la tuberculosis pediátrica en niños entre 6 y 59 meses de edad	55
4.1	Justificación	55
4.2	Pregunta de Investigación Principal	60
4.3	Hipótesis Secundarias	60
4.4	Materiales y Métodos	60
4.4.1	Diseño	60
4.4.2	Población y diseño muestral	61
4.4.2.1	Población	61
4.4.2.1.1	Criterios de inclusión	61
4.4.2.1.2	Criterios de exclusión	61
4.4.3	Muestreo	62
4.4.3.1	Tipo de muestreo	62
4.4.4	Procedimientos del estudio	62
4.4.4.1	Recolección de datos	63
4.4.4.1.1	Cuestionarios	64
4.4.4.1.2	Muestras biológicas	65
4.4.4.2	Procesamiento de muestras biológicas	65
4.4.5	Variables de estudio	68
4.4.5.1	Variable desenlace (dependiente) y co-variable principal (independiente)	68
4.4.5.2	Otras co-variables relevantes	73
4.4.5.3	Gráfico acíclico dirigido (DAG)	73
4.4.6	Procesamiento y análisis estadístico	74
4.4.7	Cálculo de tamaño de muestra o potencia estadística	75
4.5	Resultados	78
4.5.1	Enrolamiento y muestra de estudio	78
4.5.2	Análisis bivariado	81
4.5.3	Análisis de regresión múltiple	83
4.5.4	Otros análisis	83

4.6	Discusión	87
VI.	ASPECTOS ÉTICOS	95
VII.	LIMITACIONES	97
VIII.	CONCLUSIONES GENERALES	100
IX.	RECOMENDACIONES GENERALES	102
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
XI.	ANEXOS	
10.1	Anexo 1: Aprobación ética previa	
XI.1	Anexo 2: Instrumento(s) de recolección de los datos	
	*CRF Escala de exposición detallada - niño	
10.2	Anexo 3: Consentimiento informado, asentimiento informado	
10.3	Anexo 4: Otros anexos	

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribunucleico

aRP: Razón de prevalencias ajustado

BK: Baciloscopia para determinación de bacilo de Koch

BMI: Índice de masa corporal

CETR: Center of Excellence in Translational Research

CRF: Case report form

DIRIS: Dirección de Redes Integradas de Salud

DISA: Direcciones de Salud

DS: Desviación estándar

ENDES: Encuesta demográfica y de salud familiar

ESNPCT: estrategia sanitaria nacional de prevención y control de la tuberculosis

FTA: Flinders Technology Associates

GLM: Modelo lineal generalizado

HAMLET: alfa lacto albúmina humana letal para células tumorales

HMO: oligosacáridos de la leche humana

IC: Intervalo de Confianza

IFN α : Interferón gamma

IgA: inmunoglobulina A

IGRA: Ensayo de liberación de interferón gamma

IL: Interleucina

IQR: rango intercuartil

LME: Lactancia Materna Exclusiva

MGIT: Mycobacterial Growth Indicator Tube

MINSA: Ministerio de Salud del Perú

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

NIH: The National Institutes of Health

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: buffer fosfato salino

RP: Razón de prevalencias

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SES: ONG Socios En Salud

TB: Tuberculosis

UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia

USA: Estados Unidos de Norteamérica

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ZN: Coloración de Ziehl - Neelsen

RESUMEN

Introducción: La tuberculosis (TB) pediátrica, causada por el *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), es un problema de salud pública poco estudiado principalmente por la dificultad en identificar y confirmar un caso de tuberculosis. La confirmación de tuberculosis se realiza habitualmente por un cultivo en esputo. Sin embargo, en los niños hay limitaciones para obtener esta muestra debido a la dificultad de expectorar, la baja carga bacteriana en la expectoración o paucibacilaridad y la frecuencia alta de enfermedad extra-pulmonar. Por otro lado, en niños, se conocen factores de riesgo asociados al desarrollo de tuberculosis, tales como convivir con una persona con TB, nivel socioeconómico, hacinamiento o una deficiente nutrición. Entre los factores protectores se ha estudiado el rol protector de la Vitamina D y además de ser ampliamente conocido el rol protector de la lactancia materna exclusiva sobre infecciones de vías respiratorias o enfermedades diarreicas en niños resulta interesante abrir la interrogante de si la lactancia exclusiva materna podría también ser un factor protector contra la tuberculosis pulmonar activa. Sin embargo, este tipo de pregunta hasta el momento no ha podido ser respondida. Actualmente frente a los retos para el control global contra la tuberculosis resulta una necesidad mejorar los métodos diagnósticos en niños para poder contar con pruebas diagnósticas oportunas y de buen desempeño analítico además de explorar factores que puedan promover la protección contra la tuberculosis como el probable rol de la lactancia exclusiva para alcanzar las metas de la estrategia del fin de la tuberculosis planteada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2014 y que también forman parte de los objetivos de Desarrollo Sostenible.

Preguntas de investigación: 1) ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras bucales de menores de 15 años de edad?; 2) ¿Cuál es el nivel de asociación entre la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida y la tuberculosis pediátrica en niños entre 6 y 59 meses de edad?

Métodos: Luego de coleccionar información de 628 niños menores de 15 años que tuvieron antecedente de tener contacto con un adulto con tuberculosis en un estudio primario observacional denominado DETECT-niños, los datos fueron analizados. En la primera investigación, de naturaleza prueba de concepto, se coleccionaron hisopados bucales coleccionados con los dispositivos OmniSwab y EasiCollect en niños menores de 15 años. En esas muestras, se amplificó el ADN de MTB usando la RT-PCR con un método optimizado. La sensibilidad de la RT-PCR fue calculada con los casos de TB (confirmados con cultivo microbiológico y diagnosticados clínicamente) y la especificidad de la RT-PCR fue evaluada en muestras de niños sin evidencia de TB. En la segunda investigación, de tipo exploratoria, se analizó la asociación entre la lactancia materna exclusiva y la tuberculosis pulmonar activa en niños menores entre 6 y 59 meses de edad usando un modelo lineal generalizado con link log, distribución binomial y varianza robusta; se incluyeron confusores a priori y conocidos, donde además se exploró la presencia de modificadores de efecto en dos análisis pos hoc, uno considerando estratos de edad de 6 a 23 meses versus 24 a 59 meses y el segundo considerando estratos en función a si la madre fue o no el contacto índice de TB.

Resultados: En la primera investigación fueron incluidos 288 niños. La sensibilidad de la RT-PCR fue de 21% (IC95% = 7%-42%) en los 24 casos de TB confirmados por cultivo y 4.6% (IC95% = 1%-13%) en los 65 casos diagnosticados clínicamente que tuvieron cultivo negativo. La sensibilidad resultó más elevada en los frotices Ziehl – Neelsen positivos. La especificidad fue 99% (IC95% = 96%-100%) en los 199 controles incluidos. Con respecto al tipo de colección de las muestras bucales, no se encontró diferencia significativa en la sensibilidad de la prueba. En la segunda investigación se incluyeron a 279 niños, 22% de los niños fueron diagnosticados de tuberculosis y 72% fueron lactados exclusivamente, no se encontró evidencia que la lactancia materna exclusiva estuviera asociada con la tuberculosis activa tanto en el análisis bivariado ([RP] = 1.5; IC95% = 0.8–2.5) o análisis multivariado luego de ajustar por sexo e índice socioeconómico ([aRP] = 2.1; IC95% = 0.9–4.9). En el primer análisis post hoc estratificado por edad, se encontró que los lactados exclusivamente presentaron un mayor riesgo de presentar TB en el grupo de menor edad con respecto a los mayores, pero no fueron significativos ([aRP] = 2.2; IC95% = 0.8-5.8 vs [aRP] = 1.3; IC95% = 0.6-2.5, respectivamente) y en el segundo análisis post hoc estratificado según la madre sea el contacto índice o no, se halló que los lactados exclusivamente tuvieron un riesgo mayor, pero no significativo, de presentar TB cuando la madre fue el caso índice ([aRP] = 2.1; IC95% = 0.9-4.9 vs [aRP] = 1.2; IC95% = 0.6-2.4, respectivamente). A pesar de ello, los términos de interacción en la escala multiplicativa no fueron significativos (p=0.390 y p=0.380 respectivamente).

Conclusiones: El ADN de MTB logró ser detectado en las muestras bucales de los niños menores de 15 años con tuberculosis usando dos métodos bucales de

colección; pese a obtener sensibilidades menores a los reportados con otros métodos moleculares que usan diferentes tipos de muestra y población, la sensibilidad reportada en esta PCR en tiempo real es similar a la reportada con un método automatizado molecular en población y tipo de muestra similar. Por otro lado, no se encontró evidencia de un efecto protector de la lactancia materna exclusiva en la tuberculosis pulmonar en niños. Además, luego de explorar modificadores de efecto como la edad del niño y cuando la madre es el caso índice, no se evidenció un efecto modificador a la asociación entre lactancia materna exclusiva y el desarrollo de tuberculosis pulmonar en niños. Al considerar algunas limitaciones de validación en la medición de la lactancia materna exclusiva y del diagnóstico de tuberculosis, los resultados de la exploración de esta asociación deben ser interpretados con cautela y sería necesario contar con estudios que superen estas limitaciones para una conclusión más clara. Finalmente, ambos estudios agregan evidencias importantes en el diagnóstico de tuberculosis en niños y la exploración de los efectos que pueda tener una lactancia materna exclusiva con el desarrollo de tuberculosis, donde ambos tópicos merecen continuar estudiándose para lograr la reducción de los casos de tuberculosis en niños.

Palabras clave: Tuberculosis pulmonar, lactancia materna, sensibilidad y especificidad

ABSTRACT

Introduction: Pediatric tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), is a poorly studied public health problem, mainly due to the difficulty in identifying and confirming a case of tuberculosis. Confirmation of tuberculosis is usually done by sputum culture. However, in children there are limitations to obtaining this sample due to the difficulty of expectorating, the low bacterial load in the expectoration or the paucibacillarity, and the high frequency of extrapulmonary disease. On the other hand, in children, risk factors associated with the development of tuberculosis are known, such as living with a person with TB, socioeconomic status, overcrowding or poor nutrition. Among the protective factors, the protective role of Vitamin D has been studied and, in addition to the well-known protective role of exclusive breastfeeding on respiratory tract infections or diarrheal diseases in children, it is interesting to open the question of whether exclusive breastfeeding could also be a protective factor against active pulmonary tuberculosis. However, this question has so far not been able to be answered. Currently, faced with the challenges for the global control against tuberculosis, there is a need to improve diagnostic methods in children in order to have timely diagnostic tests and good analytical performance, in addition to exploring factors that can promote protection against tuberculosis, such as the probable role of exclusive breastfeeding to achieve the goals of the strategy to end tuberculosis proposed by the WHO in 2014 and which are also part of the Sustainable Development goals.

Research questions: 1) What is the diagnostic sensitivity and specificity of a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) test for the detection of DNA of

Mycobacterium tuberculosis in buccal samples from children under 15 years old?;

2) What is the level of association between exclusive breastfeeding during the first 6 months of life and pediatric tuberculosis in children between 6 and 59 months of age?

Methods: After collecting information from 628 children under 15 years of age who had a history of having contact with an adult with tuberculosis in a primary observational study called DETECT-children, the data were analyzed. In the first investigation, of a proof-of-concept nature, buccal swabs collected with the OmniSwab and EasiCollect devices were collected from children under 15 years of age. In those samples, MTB DNA was amplified using RT-PCR with an optimized method. The sensitivity of RT-PCR was calculated with TB cases (confirmed with microbiological culture and clinically diagnosed) and the specificity of RT-PCR was evaluated in samples from children without evidence of TB. In the second exploratory study, the association between exclusive breastfeeding and active pulmonary tuberculosis in children between 6 and 59 months of age was analyzed using a generalized linear model with log link, binomial distribution and robust variance; a priori and known confounders were included, where the presence of effect modifiers was also explored in two post hoc analyses, one considering age strata from 6 to 23 months versus 24 to 59 months and the second considering strata based on whether the mother was or was not the index TB contact.

Results: In the first investigation, 288 children were included. The sensitivity of RT-PCR was 21% (95% CI = 7%-42%) in the 24 culture-confirmed TB cases and 4.6% (95% CI = 1%-13%) in the 65 clinically diagnosed cases with culture negative. Sensitivity was higher in positive Ziehl-Neelsen smears. Specificity was

99% (95% CI = 96%-100%) in the 199 controls included. Regarding the type of collection of the buccal samples, no significant difference was found in the sensitivity of the test. In the second investigation, 279 children were included, 22% of the children were diagnosed with tuberculosis and 72% were exclusively breastfed, no evidence was found that exclusive breastfeeding was associated with active tuberculosis in both the bivariate analysis ([PR] = 1.5; 95% CI = 0.8–2.5) or multivariate analysis after adjusting for sex and socioeconomic index ([aPR] = 2.1; 95% CI = 0.9–4.9). In the first post hoc analysis stratified by age, it was found that exclusively breastfed infants had a higher risk of presenting TB in the younger age group compared to the older group, but they were not significant ([aPR] = 2.2; 95% CI = 0.8-5.8 vs [aPR] = 1.3; 95% CI = 0.6-2.5, respectively) and in the second post hoc analysis stratified according to whether the mother is the index contact or not, it was found that those exclusively breastfed had a higher risk, but not significant, of presenting TB when the mother was the index contact ([aPR] = 2.1, 95% CI = 0.9-4.9 vs [aPR] = 1.2, 95% CI = 0.6-2.4, respectively). Despite this, the interaction terms in the multiplicative scale were not significant (p=0.390 and 0.380 respectively).

Conclusions: MTB DNA was able to be detected in the oral samples of children under 15 years of age with tuberculosis using two oral collection methods; Despite obtaining lower sensitivities than those reported with other molecular methods that use different types of samples and populations, the sensitivity reported in this real-time PCR is similar to that reported with an automated molecular method in a similar population and sample type. On the other hand, no evidence was found for a protective effect of exclusive breastfeeding on pulmonary tuberculosis in children.

In addition, after exploring effect modifiers such as the age of the child and when the mother is the index case, there was no evidence of a modifying effect on the association between exclusive breastfeeding and the development of pulmonary tuberculosis in children. Considering some validation limitations in the measurement of exclusive breastfeeding and tuberculosis diagnosis, the results of exploring this association should be interpreted with caution and studies that overcome these limitations would be necessary for a clearer conclusion. Finally, both studies add important evidence in the diagnosis of tuberculosis in children and the exploration of the effects that exclusive breastfeeding may have on the development of tuberculosis, where both topics deserve further study to achieve the reduction of tuberculosis cases in children.

Keywords: Pulmonary tuberculosis, breastfeeding, sensitivity and specificity.

I. INTRODUCCIÓN

El *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), agente causal de la tuberculosis (TB), es una causa importante de alta mortalidad y morbilidad que se produce en infantes y niños (1-3). En el contexto actual de pandemia por COVID-19, la tendencia global de notificaciones de nuevos casos diagnosticados por TB ha tenido una abrupta caída de 18% entre lo reportado en el año 2020 en comparación al año 2019, lo cual resulta preocupante luego de haber mantenido una tendencia al incremento de la capacidad diagnóstica de la enfermedad (4) lo cual muestra una necesidad en la recuperación de la capacidad diagnóstica, especialmente en niños.

De acuerdo al último reporte de la organización mundial de la salud (OMS), en el año 2020 se reportaron aproximadamente 1.09 millones de casos de tuberculosis en niños menores de 15 años, cifra que representó el 11% de todos los casos de TB reportados ese año (4), ello evidenció una disminución de aproximadamente 9.2% en comparación al año 2019 donde se reportaron 1.2 millones de casos de niños representando el 12% del total de casos de TB(5).

El estudio de la tuberculosis en niños es sumamente retador. Los niños están en un riesgo mayor de muerte por una limitada capacidad diagnóstica. En niños menores de 15 años, en el año 2020 hubo un incremento de muertes de 0.7 % en comparación al año 2019 (228,9 mil en el año 2020 vs 227,3 mil muertes en el año 2019 aproximadamente) (4, 5), que podría ser explicado por el impacto de la COVID-19.

En las investigaciones de tuberculosis pediátrica, los estudios se ven limitados por la correcta definición de un caso. Esto debido a que la confirmación se realiza generalmente por medio de una muestra de esputo para la baciloscopía o el cultivo

(6, 7) y este tipo de muestra resulta ser difícil de obtener en niños por la incapacidad de expectoración (8) y sumado a esto, el diagnóstico en niños se complica por la paucibacilaridad, definida como la baja carga bacteriana en la expectoración, el cual durante el proceso laboratorial de descontaminación de la muestra podría dejar no viable a la poca carga bacilar existente para su cultivo (9) lo que causa la no detección de *M. tuberculosis*. Si agregamos a estas dificultades las características propias del esputo como la viscosidad, esto puede disminuir la sensibilidad, incrementar la heterogeneidad muestra a muestra e incrementar los costos por el proceso laboratorial (Figura 1). En un ámbito clínico con recursos limitados, la confirmación microbiológica se da entre 10-40% de los niños diagnosticados con TB(10-12), lo que origina el inicio de tratamiento de 6 meses a pesar de la no confirmación para evitar secuelas o muerte. Todo esto nos hace entender que hay necesidad de desarrollar mejores metodologías diagnósticas e investigar otros tipos de muestras para confirmar una TB en niños.

Ante la dificultad de obtener una muestra de esputo en niños para la identificación de MTB, se ha evaluado diferentes tipos de muestras como heces, aspirados nasofaríngeos, sangre, orina y secreciones gástricas usando metodologías como el cultivo microbiológico o técnicas moleculares, donde se ha encontrado en el caso del cultivo microbiológico sensibilidades no óptimas que varían entre 23%-40% en muestras de esputo o lavado gástrico (12-14), En general, en niños, usando diferentes metodologías y tipos de muestras biológicas se obtienen sensibilidades que varían entre 23% a 95% (12-18). Muchas de las pruebas diagnósticas en niños aún se encuentra lejos de la recomendación de la OMS para potenciales nuevas

pruebas diagnósticas para TB en niños donde se establece contar con al menos 66% de sensibilidad y 98% de especificidad en casos confirmados(19).

Un tipo de muestra prometedora para el diagnóstico de TB en niños es el hisopado bucal que en adultos puede lograr 90% de sensibilidad para identificar el ADN de *M. tuberculosis* (20). Se sabe que hay especies de *Mycobacterium* que tienen mecanismos de adhesión a superficies como a mucosa nasal o epitelio alveolar y bronquial (21, 22) o se adhieren a superficies no biológicas (23, 24). El ADN de *M. tuberculosis* ha sido identificado previamente en mucosa oral en primates humanos y no humanos (25-27). Además, en comparación al esputo, las muestras bucales en los mismos grupos de edad tienen un volumen homogéneo y con menor viscosidad o heterogeneidad (20). Todas estas características pueden hacer que las muestras bucales sean ideales tanto por la facilidad de la toma de muestra, una menor invasividad y por su prometedor desempeño diagnóstico cuando se usan pruebas moleculares.

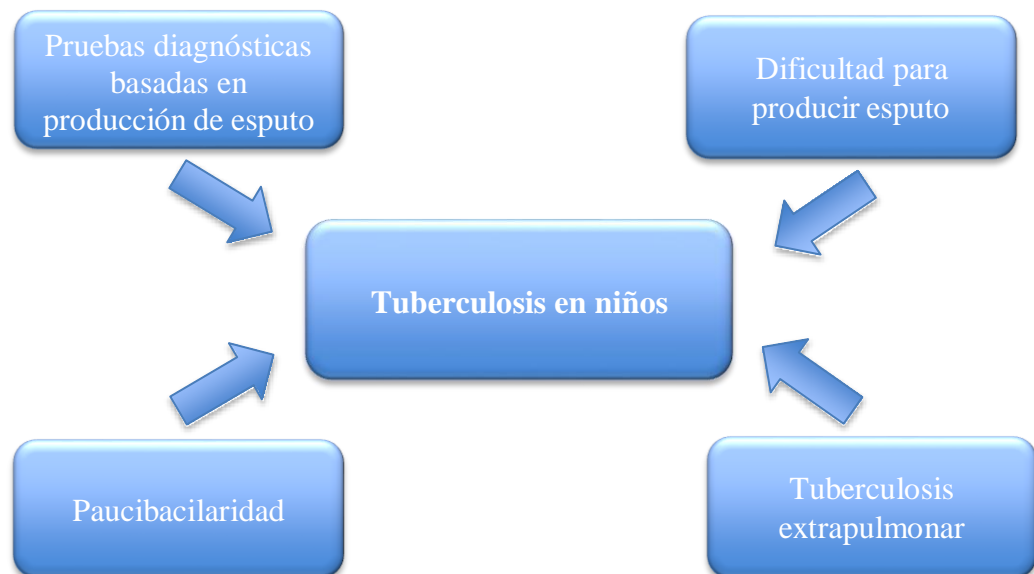
En los niños, es conocido los principales factores de riesgo a tuberculosis, entre ellos se encuentra el contacto con una persona con TB en el hogar(28), bajo estatus socioeconómico, hacinamiento, ausencia de ventilación cruzada y malnutrición (29) (figura 2). A pesar de ello, se han reportado factores protectores contra la tuberculosis como el caso de la vitamina D y es que altos niveles de esta vitamina están asociados a la disminución de incidencia de tuberculosis(30).

Es conocido que los infantes lactados exclusivamente poseen una alta protección contra una variedad de enfermedades infecciosas (31-33) o crónicas (34) debido muy probablemente al alto contenido de sustancias antimicrobianas, componentes anti inflamatorios y factores que promueven el desarrollo inmune (35, 36). Bajo

el concepto de la protección amplia de la lactancia exclusiva contra enfermedades en niños menores de 6 meses, resulta interesante conocer su relación con la tuberculosis. Sin embargo, aún no se ha asociado el nivel de protección a tuberculosis pulmonar que podría tener la lactancia materna exclusiva. En esta tesis se hipotetiza que al igual que algunas infecciones, la lactancia exclusiva materna podría ser un factor protector en la tuberculosis activa apoyados también en que participa en la maduración del sistema inmunológico de los menores de 5 años quienes en general presentan una respuesta inmunológica Th1 débil (la respuesta Th1 produce interleucinas que estimulan la inmunidad mediada por células) que les otorga una inmunosupresión relativa a la mycobacteria.

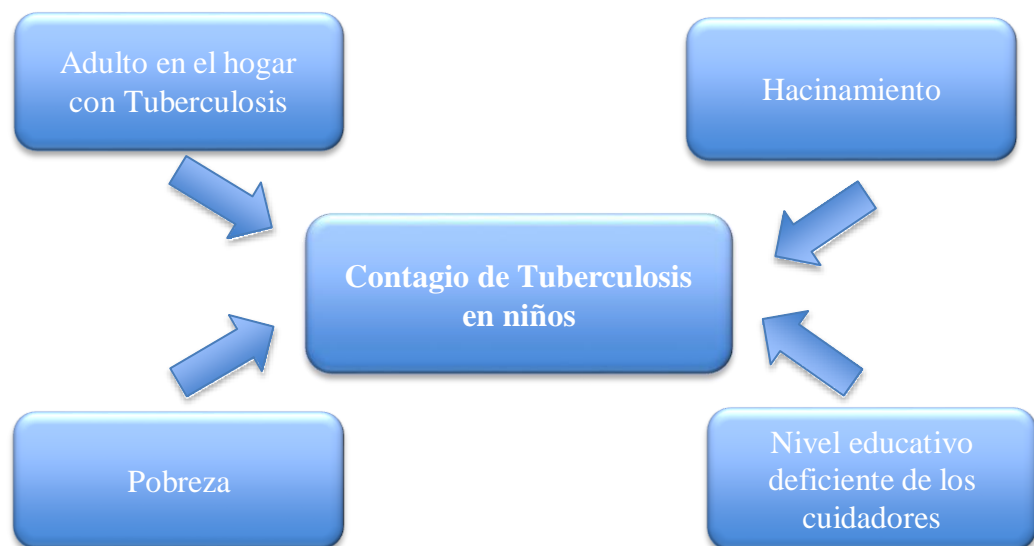
En este estudio se responderá a dos problemas relacionados con la tuberculosis pediátrica, ambos temas forman parte de un estudio primario denominado Detect – Niños, desarrollado con colaboración de instituciones internacionales como la Universidad de Harvard, Akonni Biosystems Inc., Boston Children's Hospital, el Ministerio de Salud en Perú y Socios En Salud – Sucursal Perú, todo bajo un fondo de investigación de los Institutos de Salud Nacional de los Estados Unidos de Norteamérica (USA). Ambos estudios planteados en esta tesis fueron además publicados en revistas científicas como primer autor (37, 38). En esta tesis, el primer tema a estudiar evaluará la sensibilidad y especificidad diagnóstica de dos muestras bucales colectadas con los dispositivos OmniSwab y EasiCollect en menores de 15 años para la identificación molecular de *Mycobacterium tuberculosis*. El segundo tema evaluará el nivel de asociación entre la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida y la tuberculosis pediátrica en niños entre 6 y 59 meses de edad.

Figura 1. Limitaciones para diagnosticar la tuberculosis en niños



Fuente: Elaboración propia

Figura 2. Factores que condicionan el contagio de tuberculosis en niños



Fuente: Elaboración propia

II. HIPÓTESIS GENERAL

En el primer estudio se hipotetiza que la sensibilidad de la prueba RT-PCR en muestras bucales sea óptima para el diagnóstico de la tuberculosis en menores de 15 años.

Para el segundo estudio se hipotetiza que la lactancia materna exclusiva en los seis primeros meses de vida tenga una asociación negativa con la adquisición de tuberculosis pulmonar en niños entre 6 a 59 meses de edad.

III. CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y ROL DEL INVESTIGADOR

El presente trabajo de tesis es una importante contribución al estudio de la tuberculosis pulmonar pediátrica tanto en el diseño y optimización de métodos diagnósticos como en el entendimiento de factores protectores a la tuberculosis. La contribución del tesista estuvo orientado en la concepción de la hipótesis en ambas investigaciones de la tesis. Es importante señalar que la tesis desarrollada es producto de un Estudio primario de investigación colaborativo internacional denominado Detect – niños cuyos investigadores principales forman parte de la Universidad de Harvard, Akonni Biosystems Inc. y del Boston Children’s Hospital y fue ejecutado en la ciudad de Lima por medio de la ONG Socios En Salud, Sucursal Perú ubicado en el distrito de Carabayllo – Lima. En ambas investigaciones el tesista participó activamente en la ejecución del estudio primario. La primera investigación forma parte de uno de los objetivos del estudio primario el cual buscó identificar los tipos de muestra en los cuales se detectan mejor el ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en niños con tuberculosis. El aporte del tesista en este objetivo fue trabajar con el equipo de laboratorio de Socios en Salud en el reciente laboratorio de biología molecular para diseñar y optimizar un método de diagnóstico molecular por PCR en tiempo real de las muestras de hisopado bucal en niños menores de 15 años. El trabajo intelectual estuvo orientado además a acondicionar los procesos de colección de muestras, extracción de ADN, amplificación del ADN de *Mycobacterium tuberculosis* así como en interpretación de los resultados y revisión de la base de datos laboratorial. Lo anterior no solo estuvo enfocado para las muestras de hisopados bucales, sino

también para las diferentes muestras biológicas (orina, sangre, plasma, *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC), cuerda encapsulada) que formaron parte del objetivo del estudio primario. Aquí hubo además colaboración con el equipo de Akonni Biosystems Inc., la Universidad de Harvard y del Boston Children's Hospital, con quienes se discutió y estandarizó el ensayo molecular; La presencia de una empresa de desarrollo de métodos diagnósticos como Akonni Biosystems Inc. obedecía a cumplir otro objetivo del estudio primario que estuvo enfocado en el diseño y validación de un ensayo de microfluidos para detección de *M. tuberculosis* para ser usado con las muestras colectadas del estudio, el cual se desarrolló en sus instalaciones en Maryland, USA y la participación allí fue de preparar las muestras biológicas colectadas para el envío internacional e interactuar a través de una visita de coordinación a sus instalaciones donde se diseñaba la prueba diagnóstica tipo "point of care". En la segunda investigación, el tesista formuló la hipótesis para analizar la relación entre la lactancia materna exclusiva y la tuberculosis en niños menores de 5 años, así como la exploración de posible modificadores de efecto de la asociación a evaluar. El tesista planteó el sub-análisis que fue discutido por el equipo de investigadores principales de las instituciones participantes para el uso de la información del estudio primario. Este segundo estudio contribuye a la literatura científica para conocer el rol que podría desempeñar contra la tuberculosis un alimento natural tan poderoso como la leche materna en vista a sus innegables efectos protectores para diversas infecciones en los infantes. Algunos otros roles del tesista como parte del equipo del estudio primario estuvo enfocado en: 1) Ensayar un protocolo de trabajo para poder trabajar con *M. tuberculosis* en los procesos de biología molecular con el menor

grado de riesgo de contaminación. Aquí se ensayó en muestras de esputo la eliminación de viabilidad de *M. tuberculosis* por medio del calor para disminuir la dependencia de un ambiente de bioseguridad nivel 3 para procesos de extracción de ADN, los resultados obtenidos fueron óptimos y no se evidenció crecimiento bacteriano luego del ensayo y además se demostró que el procedimiento no alteraba estructuralmente al ADN para los procesos moleculares como PCR en tiempo real. Esta participación fue evidenciada en la 49^o conferencia mundial en salud de pulmón de The Union en el año 2018 (39).

2) Durante la participación en Socios En Salud, se obtuvo un entrenamiento de dos meses (enero-febrero de 2018) en la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard en la Ciudad de Boston, USA donde forman parte los investigadores principales del estudio primario. El entrenamiento estuvo a cargo de la Dra. Molly Franke donde junto a los investigadores del equipo colaborador de Global Health and Social Medicine se discutió las dos propuestas de investigación del autor de la presente tesis (Investigación 1 y 2) para la autorización del uso de la información del estudio y así poder analizar los datos preliminares que aún se seguían colectando. Producto del entrenamiento se publicaron dos artículos científicos que forman parte de las dos investigaciones de la presente tesis doctoral.

3) El tesista brindó entrenamientos constantes en bioseguridad, uso y aplicación de los cuestionarios, y toma de muestras biológicas para el personal de campo del estudio para estandarizar los procesos en la colección de datos del estudio Detect-niños.

4) Finalmente el tesista participó en reuniones científicas en USA con el equipo principal de investigadores (Universidad de Harvard, Akonni Biosystems Inc., Socios En Salud y Boston Children's Hospital) para la presentación de resultados

preliminares y discusiones de todos los objetivos del estudio primario que es desarrollado en conjunto por Centro de Excelencia en Investigación Traslacional al que pertenecen las instituciones del estudio primario. Finalmente los resultados mostrados en el presente trabajo de investigación muestran los desafíos en el diagnóstico de tuberculosis en niños que intentan superar los métodos moleculares como el usado en el trabajo de tesis y además en explorar el rol que puede desempeñar la lactancia materna exclusiva en la protección contra la tuberculosis lo cual era un análisis aun no explorado.

IV. INVESTIGACIÓN 1

“Evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras bucales de niños menores de 15 años de edad”

3.1 Justificación

La tuberculosis pediátrica continúa siendo una causa importante de mortalidad y morbilidad. En el año 2020, 1.09 millones de niños menores de 15 años llegaron a contraer la tuberculosis; 229 mil de ellos murieron de la enfermedad (4).

El diagnóstico convencional de tuberculosis hace uso de una muestra de esputo, que muchos niños no pueden producir, haciendo de la colecta de esta muestra todo un reto (8). Sumado a ello, está la frecuente paucibacilaridad de las mycobacterias en este grupo, definida como la baja carga bacilar en la expectoración. Así también, en general, una muestra de esputo posee un alto grado de viscosidad que dificulta su procesamiento laboratorial (9, 25). Todo ello hace que las pruebas laboratoriales basadas en esputo para el diagnóstico de tuberculosis en niños tengan una sensibilidad baja.

Se han evaluado diferentes metodologías diagnósticas y tipos de muestra entre menos invasiva y no invasivas para revertir esta situación, obteniéndose valores variables de sensibilidad (tabla 1). Entre ellas, las muestras menos invasivas como la cuerda encapsulada y las no invasivas como las muestras

de heces u orina, han sido ampliamente estudiadas en niños, pero no sobrepasan la sensibilidad del esputo o el aspirado gástrico.

Un tipo de muestra prometedora es el hisopado bucal. Algunos resultados que apoyarían la posibilidad de encontrar ADN de *M. tuberculosis* en hisopados bucales, es que el ADN de *M. tuberculosis* ha sido detectado en la mucosa oral de primates humanos y no humanos (25-27), así también algunas especies de Mycobacterium como *M. leprae* pueden adherirse a superficies de mucosa nasal o epitelios alveolar (21) y el *M. avium* lo puede hacer en epitelio bronquial (22). En un estudio piloto en Sudáfrica se evaluó la sensibilidad y especificidad de una prueba de PCR en tiempo real para la amplificación de la región IS6110 en hisopados bucales colectados en pacientes adultos con tuberculosis y en pacientes controles sanos de USA; allí se encontró una sensibilidad de 90% y especificidad de 100% usando como método de referencia a la prueba GeneXpert (20). Los resultados fueron prometedores, sin embargo, el estudio fue un piloto a pequeña escala donde se colectaron 40 sujetos adultos entre casos y no casos de tuberculosis en igual proporción y no consideró a menores de edad.

Recientemente en el año 2019, mientras la colección de datos de este trabajo de tesis culminaba en el año 2018, el mismo grupo de investigación del estudio en Sudáfrica, detectó el ADN de *M. tuberculosis* en hisopados bucales de 165 niños con tuberculosis confirmada y no confirmadas (40). En dicho estudio, el 11% de los niños estuvieron infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que podría condicionar a la co-infección

por tuberculosis, además, los investigadores usaron un único dispositivo de toma de muestra bucal.

Resulta interesante evaluar nuevas alternativas de ayuda diagnóstica de tuberculosis en niños, además de ensayar en qué tipos de dispositivos de colección de muestras bucales se podría lograr mayor sensibilidad.

En esta primera investigación de tesis doctoral, el objetivo es determinar la sensibilidad y especificidad de una prueba de PCR en tiempo real usando dos muestras bucales colectados con dos dispositivos denominados OmniSwab y EasiCollect para la detección de *M. tuberculosis* en niños menores de 15 años de edad.

Tabla 1. Desempeño analítico de los Métodos de detección de *M. tuberculosis* para tuberculosis pulmonar en niños

Año de publicación	País	Tipo de muestra	Blanco a detectar	Edad	n	Prueba índice	Prueba de referencia	Sensibilidad (IC95%)*	Especificidad (IC95%)*	Referencia
2003	Perú	Aspirado Nasofaríngeo	IS6110	<16 años	106	PCR Heminested	Cultivo MGIT o LJ	58% (NR)	100% (NR)	(17)
2019	Perú	Heces	IS6110	<15 años	259	PCR en tiempo real	Cultivo MGIT	59% (NR)	97% (NR)	(16)
2019	Sudáfrica	Hisopado bucal	IS6110	<15 años	165	PCR en tiempo real	Cultivo MGIT o RT-PCR Xpert MTB/Rif	En Casos confirmados 43% (27-59) En casos clínicamente diagnosticados 24% (NR)	93% (81-99)	(40)
2013	Zambia	Aspirado gástrico	rpoB	≤15 años	142	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo MGIT	82% (48-98)	99% (96-100)	(41)
2015	Sudáfrica	Esputo	rpoB	≤14 años	345	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo MGIT	100% (74-100)	100% (99-100)	(42)

2014	Malawi	Espuito inducido	rpoB	<16 años	300	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo MGIT	100% (16-100)	100% (98-100)	(43)
2013	Sudáfrica	Heces	rpoB	<16 años	452	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo líquido	50% (21-79)	100% (79-100)	(44)
2018	Sudáfrica	Espuito inducido	rpoB	<16 años	367	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo MGIT	100% (94-100)	100% (99-100)	(45)
2014	China	Lavado bronqueo alveolar	rpoB	<16 años	255	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo LJ y MGIT	86% (67-96)	73% (66-78)	(46)
2012	Tanzania	Espuito o Espuito inducido	rpoB	<16 años	164	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo LJ y MGIT	39% (22-59)	98% (93-100)	(47)
2013	Uganda	Espuito inducido	rpoB	<16 años	235	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo LJ y MGIT	39% (23-58)	100% (98-100)	(48)
2013	China	Lavado bronqueo alveolar	NR	<16 años	30	LightCycler 480 (Roche)	Cultivo Bact/Alert 3D	50% (23-77)	100% (79-100)	(49)
2012	Sudáfrica	Aspirado nasofaríngeo	rpoB	<16 años	535	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo MGIT	26% (18-37)	100% (99-100)	(50)
2013	Sudáfrica	Espuito inducido y Aspirado	rpoB	<16 años	384	RT-PCR Xpert MTB/Rif	Cultivo MGIT	30% (15-49)	99% (97-100)	(51)

		nasofarín geo								
2014	Sudáfrica/Malawi/Kenia	Sangre total	51-gene mRNA signature	<15 años	503	Microarray	Cultivo	83% (69-94)	84% (75-93)	(52)
2014	Tanzania	PBMCs	Células T CD4+ CD27+	<15 años	130	Citometría de flujo	Cultivo	83% (59-96)	97% (89-99)	(53)
2014	Sudáfrica	Orina	Antígeno Lipoarabimano	<15 años	535	Elisa y ensayo de flujo lateral	Cultivo	2% (0-8)	96% (93-97)	(54)
2015	Tanzania	Orina	Antígeno Lipoarabimano	<15 años	132	Elisa y ensayo de flujo lateral	Cultivo	44% (NR)	97% (NR)	(55)
2001	Argentina	Suero	Anti rec-Ag 16 IgG, IgM y IgA	<15 años	272	Elisa	Cultivo	IgG + IgA 43% (NR)	IgG + IgA 97% (NR)	(56)
2013	Sudáfrica	Plasma	Citokinas	<15 años	76	ELISA	Cultivo	84% (NR)	84% (NR)	(57)

3.2 Pregunta de Investigación Principal

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad diagnóstica de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras bucales de niños menores de 15 años de edad?

3.3 Hipótesis Secundarias

El tipo de dispositivo de colección de muestras bucales es un factor asociado a la detección de *M. tuberculosis* en los hisopados bucales de niños con TB confirmada.

3.4 Materiales y Métodos

El presente estudio se encuentra anidado en el estudio principal denominado: “Estrategias innovadoras para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis en niños (DETECT – niños)” el cual fue ejecutado por Socios En Salud – Sucursal Perú y la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard con el financiamiento de los National Institutes of Health (NIH) para el Center of Excellence in Translational Research (CETR) grant N°U19 AI109755.

3.4.1 Diseño

El estudio DETECT-niños que en adelante denominaremos estudio primario, tiene como objetivo general proporcionar información crítica en el manejo clínico de la tuberculosis y desarrollar y hacer uso de una herramienta de

diagnóstico rápido, sencillo y sumamente preciso que ayude a los médicos a realizar diagnóstico en niños menores de 15 años que presenten signos y síntomas sugestivos de tuberculosis. Para ello se plantearon 5 objetivos específicos: 1) Identificar patógenos respiratorios en niños que presentan un cuadro clínico de tuberculosis; 2) Identificar los tipos de muestra en los cuales se detectan mejor el ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en niños con tuberculosis; 3) Determinar si el ADN libre de células de *Mycobacterium tuberculosis* puede ser detectado en plasma o en muestras de orina en niños y adultos con tuberculosis; 4) Identificar discrepancias entre las definiciones de casos clínicos estandarizadas para tuberculosis pediátrica por los médicos y 5) Entender mejor cuales son las barreras para el inicio rápido de tratamiento después de un diagnóstico de tuberculosis. Este estudio primario es un estudio que empezó con una meta de enrolamiento de 1843 participantes entre adultos y niños con sospecha de tuberculosis y el enrolamiento inició en el año 2015 y concluyó en febrero de 2018. En el estudio primario la inclusión de muestras bucales de adultos tuvo como fin la optimización de la prueba molecular, por tanto no formó parte del análisis de la investigación 1 de la tesis. Además las otras muestras de adultos como orina, fueron usadas para cumplir el objetivo 3 del estudio primario.

Para el análisis de la primera investigación de la tesis doctoral, la naturaleza del estudio es una prueba de concepto donde el diseño del estudio fue prospectivo transversal, sin seguimientos, donde tanto la prueba de referencia y la de comparación para confirmación de tuberculosis en cada tipo de muestra fueron colectadas al mismo tiempo. Se usó la información y muestras

colectadas de los 628 niños enrolados previamente del segundo objetivo del estudio primario. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de una prueba molecular de PCR en tiempo real en muestras bucales usando diferentes definiciones de caso de tuberculosis.

3.4.2 Población y diseño muestral

3.4.2.1 Población

Entre mayo de 2015 a febrero de 2018 se enrolaron a los niños menores de 15 años en Lima - Perú en un estudio que se enfocó en identificar diferentes tipos de muestras alternativas para el diagnóstico de tuberculosis pediátrica. Los participantes tuvieron una historia de contacto con un adulto con tuberculosis pulmonar en los dos años previos al enrolamiento y tuvo uno o más de los siguientes síntomas consistentes con una tuberculosis intratorácica, la cual fue persistente y no explicada: tos por más de 14 días, pérdida de peso, fiebre persistente o fatiga. Los participantes fueron enrolados en 49 centros de salud y hospitales pertenecientes a las direcciones de salud (DISA) II y DISA IV de Lima. Las DISAs (Hoy DIRIS Centro, DIRIS Norte) tienen a su cargo los centros de salud y hospitales del ministerio de salud de forma descentralizada. Se eligieron estas DISA debido a que acumulan una de las mayores prevalencias e incidencias de tuberculosis en el Perú.

3.4.2.1.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión del estudio primario fueron:

- Edad menor a 15 años
- Buscar atención en un establecimiento de salud de las DIRIS Centro y DIRIS Norte.
- Tener antecedente de contacto con un adulto con tuberculosis pulmonar.
- Presentar uno de los siguientes criterios: tos persistente por más de dos semanas, haber experimentado pérdida de peso o déficit de crecimiento, tener fiebre persistente mayor a 38 grados sin explicación y mayor a una semana y presentar fatiga o disminución de las ganas de jugar de manera persistente reportada por el padre o cuidador.
- Proporcionar el consentimiento/asentimiento informado

Para la primera investigación de la tesis no se incluyeron nuevos criterios de inclusión.

3.4.2.1.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión del estudio primario fueron:

- Haber iniciado tratamiento anti tuberculoso si ya ha sido diagnosticado con tuberculosis.

No se adicionaron nuevos criterios de exclusión en el diseño de la primera investigación. Sin embargo, hubo exclusiones para el análisis, principalmente por evaluaciones pendientes o por no contar con muestras bucales disponibles

o producto del emparejamiento entre casos y controles por edad y fecha de colección de la muestra.

3.4.3 Muestreo

3.4.3.1 Tipo de muestreo

El muestreo del estudio primario fue consecutivo. La unidad de muestreo fue el participante. Los pacientes que acudieron a los establecimientos de salud de las DISAS II y IV de Lima Metropolitana fueron contactados por personal del estudio que visitaban constantemente los centros con apoyo del personal de la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis (ESNPCT). La búsqueda de potenciales participantes se realizó mediante la revisión de los libros de registros de los sintomáticos respiratorios y de los pacientes diagnosticados con tuberculosis cumpliendo los criterios de elegibilidad. El personal del centro de salud tuvo el primer contacto con el participante potencial quien luego fue derivado con el personal del estudio primario para verificar los criterios de elegibilidad. Luego de la invitación a participar por el personal de salud de los centros de salud, el personal del estudio DETECT inició el tamizaje para enrolar a un participante potencial. Este tamizaje se inició con la verificación de los criterios de elegibilidad descritos previamente. El consentimiento informado para la toma de datos y muestras biológicas fue otorgado por los cuidadores y el asentimiento informado por los niños de 8 a 14 años.

3.4.4 Procedimientos del estudio

Al identificar un potencial participante, se le ofreció al participante y también al padre o cuidador información impresa con imágenes sobre el estudio y sus objetivos para luego invitarlos a participar. Luego de aceptar su participación, se les describió de forma completa el estudio y sus riesgos/beneficios para la obtención del consentimiento/asentimiento informado.

3.4.4.1 Recolección de datos

3.4.4.1.1 Cuestionarios

Muchos de los datos provienen de los formatos de reportes de caso (Case Report Form, CRF) que se usaron como instrumento principal en el estudio. Estos CRF han sido validados en la institución ejecutora Socios En Salud (SES) a lo largo de estudios de tuberculosis realizados anteriormente. SES posee amplia experiencia en este tipo de estudio y siempre en colaboración con la filial principal *Partners in Health* y la Universidad de Harvard. Todo el personal del estudio incluido reclutadores, digitadores, personal de laboratorio e investigadores fue entrenado en temas de buenas prácticas clínicas y principios éticos de los estudios de investigación antes de la ejecución del estudio. Además, el personal de reclutamiento del estudio fue entrenado en los procedimientos de aplicación de consentimiento informado, codificación de participantes, colección de muestras, transporte de muestras, aplicación electrónica en celulares de los CRFs que contienen los cuestionarios y subida de

información de datos de reclutamiento por un sistema informático de la institución denominado SEIS.

Adicionalmente los procedimientos de laboratorio contaron con un entrenamiento previo en técnicas de biología molecular así como seguir las pautas del control de calidad interno que posee el laboratorio Socios En Salud, la institución ejecutora.

En el estudio primario se aplicaron 21 cuestionarios entre los que figuran: cuestionarios de antropometría, aplicación de PPD, BK y cultivo, datos del padre o apoderado, detalles del caso índice, disposición de repetir el procedimiento, escalas de exposición detallada, examen físico, historia de TB, historia médica, inseguridad alimentaria, lectura de PPD, nivel de comodidad, prueba de embarazo, prueba de la cuerda encapsulada (es un CRF usado para detallar la percepción en los niños al tragar una capsula adherida a una cuerda, usado para el análisis microbiológico de *M. tuberculosis*), revisión de historia clínica, revisión de radiografía de tórax, síntomas, sociodemográfico, valoración de dolor a la prueba. Los cuestionarios usados para la tesis doctoral se muestran en el anexo 2.

Cada uno contuvo preguntas cortas y puntuales de donde se colectaron los datos. Todos estos datos fueron colectados por el personal del estudio mediante una entrevista con el participante o por extracción de datos de registros físicos. Estos datos fueron almacenados inmediatamente en un teléfono móvil que poseía una aplicación creada específicamente para el estudio denominada 'SEIS' el cual organiza los datos de participantes y almacena la información para un seguimiento en tiempo real de cuántos

potenciales participantes serían reclutados y poder organizar el trabajo de las demás áreas del estudio. Los supervisores de proyecto y personal de otras áreas como el laboratorio tienen acceso a datos específicamente relacionado a su labor para poder realizar este seguimiento en tiempo real. La mayoría de las preguntas eran de opciones múltiples y unas pocas fueron observaciones que el entrevistador anotaba adicionalmente. El tiempo aproximado de aplicación de los cuestionarios estuvo en el rango de 45 minutos a hora y media. No todos los cuestionarios fueron usados para los niños debido a que había cuestionarios para adultos, para los casos índices y luego para los niños que podrían vivir dentro del hogar de un caso índice. La información colectada de los adultos fue usada para el cumplimiento de otros objetivos del estudio primario y no de la tesis doctoral presentada. Los cuestionarios usados exclusivamente para esta primera investigación en niños menores de 15 años fueron los CRF de antropometría, aplicación de PPD, BK y cultivo, datos del padre o apoderado, disposición de repetir el procedimiento, examen físico, historia de TB, historia médica, lectura de PPD, revisión de historia clínica, revisión de radiografía de tórax, síntomas, sociodemográfico.

3.4.4.1.2 Muestras biológicas

Los tipos de muestras colectadas para el estudio primario fueron hisopados bucales, esputo, aspirado gástrico, orina, heces, sangre y cuerda encapsulada. Para el presente trabajo de tesis, la prueba de referencia basada en el cultivo bacteriológico MGIT se realizó a las muestras de esputo o aspirado gástrico de los niños.

Hisopados bucales

Los hisopos bucales usados para esta primera investigación doctoral fueron colectados con dos dispositivos comerciales el Omniswab y el Easicollect, ambos tipos de dispositivos están validados para la colecta de material genético en muestra bucal y en saliva. Sus componentes aseguran una máxima captación y liberación adecuada del material genético que son usados luego en procesos de extracción de ácidos nucleicos. Según un estudio previo se conocía que el Omniswab era capaz de colectar material genético de *M. tuberculosis* mediante hisopado bucal (20). En el estudio se optó por probar un segundo método de colección denominado EasiCollect dada sus ventajas de campo: el EasiCollect, a diferencia de Omniswab, es una esponja que se usa para colectar la muestra bucal y luego el contenido colectado es adherido en una tarjeta de FTA y esta tarjeta es doblada para su almacenamiento y transporte el cual no requiere de refrigeración y puede durar un tiempo prolongado a temperatura ambiente y con buena integridad. Los costos aproximados unitarios de cada dispositivo es de aproximadamente \$8.2 para Easicollect y unos \$1.8 para el Omniswab (sin incluir el uso de un microtubo de 2mL que contiene el buffer de lisis). Un personal del estudio previamente entrenado colectó una sola muestra bucal de la zona posterior de la mejilla (Usando el EasiCollect u Omniswab) de todos los niños previo al tratamiento. Para ello, en cada caso se usaron 5 movimientos suaves pero firmes en la zona detrás de cada mejilla por unos 10 segundos. Para el uso en los niños de EasiCollect u Omniswab no hubo un criterio establecido.

Hisopado bucal usando Omniswab

El Omniswab (Whatman, catalog #WB100035) incluye un hisopo comercial (seco) con el cual se colectó la muestra bucal por medio de 5 movimientos suaves de la zona detrás de cada mejilla por unos 10 segundos, luego de ser usado para la colección de la muestra bucal fue introducido en un microtubo con 500 μ L de buffer de lisis preparado in-house para liberar el contenido celular bacteriano como fue descrito previamente (20, 58).

Este dispositivo necesita luego ser transportado al laboratorio entre 2°C-8°C. Una vez en el laboratorio, el vial es congelado a -80°C hasta su procesamiento.



Imagen tomada de: <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/product/aldrich/whawb100035>

Hisopado bucal usando EasiCollect

El EasiCollect device (Whatman catalog #WHAWB120210), consiste de una almohadilla con un aplicador a manera de bisagra el cual es clocado en uso en la zona detrás de cada mejilla, debajo de la lengua y empapada con saliva por unos 10 segundos haciendo movimientos suaves. Luego de colectada la

muestra, se transfiere a la tarjeta incorporada en el dispositivo conocida como FTA (Flinders Technology Associates) cuyo componente es un papel de celulosa a base de algodón. Posterior a ello, el dispositivo se cierra por unos 5 minutos para que se adhiera la muestra en el FTA-card y se seque. El transporte al laboratorio se realizó a temperatura ambiente y dentro del laboratorio fue almacenada a -20°C hasta su procesamiento.

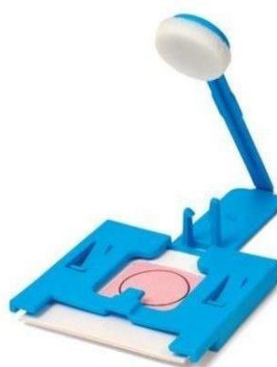


Imagen tomada de: <https://www.environmental-expert.com/products/cytiva-easycollect-forensics-cards-kits-and-collector-581660>

Aspirados gástricos. Fueron colectados por medio de un procedimiento especial llevado a cabo en los centro de salud u hospitales que involucra introducir una sonda y aspirar mecánicamente el contenido gástrico hacia un recipiente de colección estéril. En el mismo lugar de colección se midió el pH antes del transporte. Del total del volumen, una gran parte fue almacenada en forma cruda y 2mL del esputo original pasó un proceso de descontaminación por un protocolo estándar donde finalmente fue resuspendido en 1.5mL de buffer. 500 μL de este volumen fue usado para el cultivo en BD BACTEC™ MGIT™ (Becton

and Dickinson, USA) y 2 alícuotas de 0.5 mL fueron almacenadas a -80°C hasta su extracción de ADN.

Espuito. Este tipo de muestra fue auto-colectada por los participantes donde previamente se les indicó que deben extraer el contenido del fondo de la garganta mediante una expectoración y no una emisión de saliva solamente, para lo cual se les entregó un recipiente de plástico de 100mL estéril de boca ancha con tapa rosca. Del total del volumen, una gran parte fue almacenada en forma cruda y 2mL del espuito original pasó a un proceso de descontaminación por un protocolo estándar donde finalmente fue resuspendido en 1.5mL de buffer PBS. 500 µL de este volumen fue usado para el cultivo en BD BACTEC™ MGIT™ (Becton and Dickinson, USA) y 1mL fue almacenado a -80°C hasta su extracción de ADN.

3.4.4.2 Procesamiento de muestras biológicas

Todas las muestras colectadas de espuito, aspirado gástrico e hisopados bucales luego de la colección fueron mantenidas en cadena de frío entre 2°C - 8°C dentro del lugar de colección que podría ser el centro de salud, hospital o domicilio del participante. Luego, las muestras fueron transportadas en la misma cadena de frío hasta el laboratorio donde fueron recepcionadas, registradas, re-codificadas con un código de muestra diferente al código asignado del participante y finalmente alícuotadas para su almacenamiento o procesadas inmediatamente para los estudios

microbiológicos. En el caso de las alícuotas destinadas a la prueba de PCR en tiempo real, las alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta el momento del proceso de extracción de ADN y amplificación por PCR.

Cultivo bacteriológico de las muestras alicuotadas.

El análisis bacteriológico se realizó inmediatamente luego de la recepción de las muestras de esputo y aspirado gástrico. Cada muestra cruda, inicialmente se tiñó por la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), luego las muestras se descontaminaron siguiendo el método de NALC-NAOH (2% de NaOH/ 0.25% n-acetyl-L-cysteine (NALC)) y se concentraron por centrifugación entre 2000g y 3000g durante 20 minutos. Los sedimentos se neutralizaron en un tampón fosfato y se suspendieron al final en 1.5mL de tampón PBS. 500 µL de esta suspensión se sembró en el sistema de cultivo automatizado BD-BACTEC MGIT (BD, Sparks, USA). Los tubos del sistema BD-BACTEC MGIT (BD, Sparks, USA) se colocaron en el equipo que realiza la lectura automatizada del crecimiento bacteriano por el principio de consumo de oxígeno, el cual es evidenciado por una señal eléctrica enviada al equipo que es interpretado como crecimiento positivo o negativo al cabo de 7 – 13 días. Este cultivo solo muestra crecimiento de forma cualitativa, pero además podría ser causado por bacterias diferentes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, por ello luego de obtener un crecimiento positivo, se realizó la confirmación bacteriológica primero tiñéndola bajo la coloración de Ziehl-Neelsen para identificación de bacilos

alcohol resistentes sugestivos de *M. tuberculosis* y cuando resultó positivo, éstas pasaron a una confirmación mediante una prueba inmunocromatográfica que detecta al antígeno MTP 64 específico de este complejo bacteriano y luego de ello el cultivo se clasificó como perteneciente o no al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Extracción de ADN de Muestras de hisopados bucales. Para la extracción de ADN de las muestras orales se usó el kit de extracción QIAamp DNAm mini kit (Qiagen, MD, USA) siguiendo inicialmente las indicaciones del fabricante y según lo reportado anteriormente (20). Durante la optimización de la cantidad inicial de muestra a usar, en el Omniswab se usaron volúmenes de 0.25mL a 0.5mL y en el FTA se usó inicialmente 1/3 del único círculo de la tarjeta FTA para luego concluir el protocolo con el uso de todo el círculo tarjeta.

Amplificación de ADN de *M. tuberculosis* por PCR en tiempo real

El ADN del MTB DNA fue amplificado en duplicado para el elemento de inserción IS6110 por PCR en tiempo real usando el Roche 480 Lightcycler (Basel, Switzerland). Una muestra se consideró positiva si para ambas réplicas el cycle of threshold (Ct) value fue <37 y la diferencia de fluorescencia fue >6 unidades. Las réplicas discordantes fueron consideradas negativas para ADN de MTB y en caso de algún resultado de PCR negativo en el grupo de los casos, las muestras fueron

concentradas para correr una segunda prueba de PCR (20). El personal de laboratorio estuvo ciego al diagnóstico de tuberculosis de las muestras.

La prueba RT-PCR para la detección del gen IS6110 se basó en un artículo publicado para amplificación de ADN de *M. tuberculosis* de hisopados bucales (20). La participación como tesista en este procedimiento estuvo concentrado en lograr una optimización del procedimiento molecular junto al equipo del Laboratorio de Socios en Salud y en coordinación con los investigadores de la Universidad de Harvard, Akonni Biosystems Inc. y del Boston Children's Hospital. La optimización se dio en cuanto a la cantidad de muestra a usar por tipo de muestra, los tiempos de cada procedimiento de extracción de material genético así como los volúmenes de los reactivos a usar para finalmente adecuar las condiciones adecuadas en la amplificación del ADN estableciendo para ello medidas para la reducción de la contaminación cruzada y procedimientos con menor riesgo de contaminación biológica. Luego de la optimización quedó establecido el uso de un volumen final de reacción de PCR de 25µL que incluyó 5µL del ADN extraído. Las reacciones de amplificación usaron el reactivo Lightcycler master mix (Roche diagnostics, Nederland, BV) así como los cebadores y sondas para la amplificación (tabla 2 y 3). Cada corrida de muestras se realizó por duplicado y en cada placa de corrida se incluyeron los controles de corrida así como los controles de extracción de cada grupo de muestras extraídas previamente. Para la amplificación, se usó el protocolo de PCR en tiempo real de la tabla 3.

Tabla 2. Secuencias de la sonda y los cebadores

Nombre	Secuencia (5'-3')	Marca/Vendedor	Escala típica para pedido	Purificación
TBCSAV-F	GGG-TAG-CAG-ACC-TCA-CCT- ATG	Eurofins/Operon	0,2-1,0 µmol	HPLC
TBCSAV-R	AGC-GTA-GGC-GTC-GGT-GA	Eurofins/Operon	0,2-1,0 µmol	HPLC
TBCSAVEL -P	6FAM-TCG-CCT-ACG-TGG- CCT-TT-mgb	Life Technologies	6000 pmol	HPLC

Tabla 3. Protocolo de PCR en tiempo real usado

Componente y concentración	Volumen (µL)
Mezcla de reacción 10x Roche (1a + 1b)	2.5
MgCl ₂ 25 mM	2.5
Cebador: TBCSAV-F (45 µM)	0.25
Cebador: TBCSAV-R (45 µM)	0.75
Agua libre de nucleasa	13.75
Sonda: TBCSAVEL-P (FAM - MGB) (25 µM)	0.25
ADN extraído	5.0

3.4.5 Variables de estudio

3.4.5.1 Variable desenlace (dependiente) y co-variable principal (independiente)

No aplica la definición de variable independiente para este estudio por tratarse de un estudio diagnóstico. Sin embargo, vale la pena describir el desenlace de interés que si bien estará más enfocado en la sensibilidad de la prueba molecular de PCR en tiempo real, detallaremos también la especificidad resultante de la prueba. El contar con una prueba para el diagnóstico de tuberculosis en niños con alta sensibilidad se torna actualmente en una necesidad muy importante para el control de la tuberculosis y poder lograr los objetivos de desarrollo sostenible para el año 2030 (59). Debido a lo anterior, en el estudio se evaluó la sensibilidad y especificidad usando como prueba de referencia al cultivo microbiológico de muestras de esputo o aspirados gástricos a través del método BD-BACTEC MGIT (BD, Sparks, USA), luego se evaluó la sensibilidad y especificidad usando el criterio clínico del participante apoyados en la definición de tuberculosis pulmonar en niños que fue dado bajo consenso de panel de expertos del cual el estudio primario se basó para la clasificación de los niños para los análisis de los estudios diagnósticos (60). El diagnóstico clínico en el estudio fue dado por un médico neumólogo pediatra y fue basado en la radiografía de tórax frontal y lateral, el contacto del niño con un caso confirmado de TB, de tener un cuadro compatible con TB y el resultado de pruebas PPD o

IGRA. Este criterio fue también usado en otras publicaciones relacionadas a tuberculosis en niños (16, 40, 54, 61-63).

3.4.5.2 Otras co-variables relevantes

Posibles factores asociados a la positividad de la prueba diagnóstica:

- Edad
- Tipo de dispositivo usado para la colección del hisopado bucal (EasiCollect u OmniSwab)
- Sexo
- Resultado de baciloscopía
- Presencia de cavidades en la radiografía de pecho.
- Días con tos a la presentación al centro de salud
- Días de fatiga del niño
- Duración de la fiebre a la presentación al centro de salud

3.4.5.3 Gráfico acíclico dirigido (DAG)

No aplica

3.4.6 Procesamiento y análisis estadístico

El análisis de los resultados se hizo mediante un análisis de casos y controles pareados según edad y fecha de colección de la muestra, para la evaluación de sensibilidad y especificidad. Los casos fueron clasificados según resultado de cultivo de MTB o según criterio clínico que tendría cultivo negativo de MTB. No hubo información disponible para corregir los resultados por variables como el centro de salud que podrían hacer variar el criterio clínico usado. El grupo de controles fueron las muestras de niños donde la tuberculosis fue descartada previamente (clínicamente y por resultado de cultivo microbiológico). Las variables como edad, sexo, resultado de PPD, resultado de tinción por Ziehl-Neelsen y resultado de rayos X de tórax fueron descritas en un análisis univariado. La sensibilidad para la detección de ADN de MTB de las muestras orales en el grupo de los casos, se estimó en forma conjunta y separadamente según el tipo de colección (EasiCollect u Omniswab). Además, se analizó según grupo de edad (0-4, 5-9 y 10-14 años) y resultado de la tinción de Ziehl-Neelsen. La especificidad de qPCR fue analizada en el grupo control de los niños. Mediante un análisis bivariado usando modelos lineales generalizados de distribución binomial, se analizaron los factores asociados a un resultado positivo de qPCR en muestras bucales de los casos TB confirmados por cultivo microbiológico. No fue posible realizar un análisis multivariado debido a los pocos casos TB confirmados encontrados. El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico

Stata, versión 16.1 (StataCorp, College Station, TX). Seguimos las recomendaciones dadas por Cole (64) para reportar las precisiones numéricas para los porcentajes, intervalos de confianza y valores-p.

3.4.7 Cálculo de tamaño de muestra o potencia estadística

La prueba de referencia para tuberculosis es el cultivo, cuya sensibilidad en adultos puede superar el 90% (65). Sin embargo, en la tuberculosis pediátrica la sensibilidad del cultivo solo alcanza el 40% (14). Para este estudio se hipotetiza superar este valor de sensibilidad de la prueba con la novedad de usar una prueba molecular como la PCR en tiempo real y muestras menos invasivas y menos laboriosas como los hisopados bucales. Usando como referencia la sensibilidad de 40% del cultivo microbiológico en niños y una especificidad de 80% así como una prevalencia de casos de tuberculosis en niños de 5%, se necesitaría incluir a 320 niños (que incluiría 16 casos confirmados de tuberculosis) para lograr un poder de 81% en la detección de un cambio en la sensibilidad de 40% a 75% (valor esperado de la sensibilidad de la prueba a evaluar) y un cambio en la especificidad de 80% a 88% usando una prueba binomial de dos colas considerando un nivel de significancia de 0.05.

Además se realizaron cálculos adicionales para otros posibles escenarios y se encontraron los siguientes resultados:

One-Sample Sensitivity Power Analysis

Numeric Results for testing H0: Se = Se0 vs. H1: Se ≠ Se0

Test Statistic: Binomial Test

Power		Sample Size		Sensitivity		Specificity		Alpha		Prevalence	
Sens.	Spec.	N1	N	H0	H1	H0	H1	Target	Sens.	Spec.	P
0.8043	0.9768	32	640	0.400	0.650	0.800	0.860	0.050	0.0457	0.0479	0.050
0.8135	0.8956	22	440	0.400	0.700	0.800	0.860	0.050	0.0290	0.0435	0.050
0.8103	0.9579	16	320	0.400	0.750	0.800	0.880	0.050	0.0375	0.0372	0.050
0.8702	0.9436	14	280	0.400	0.800	0.800	0.880	0.050	0.0256	0.0459	0.050

*N1 son los casos con TB que tendría que incluirse para lograr la prevalencia de 5%, N es la cantidad total de participantes a incluir.

**Son las condiciones usadas para el reporte del tamaño de muestra del estudio.

Todos los cálculos de poder estadístico se realizaron con el programa PASS versión 11 (Utah, USA).

3.5 Resultados

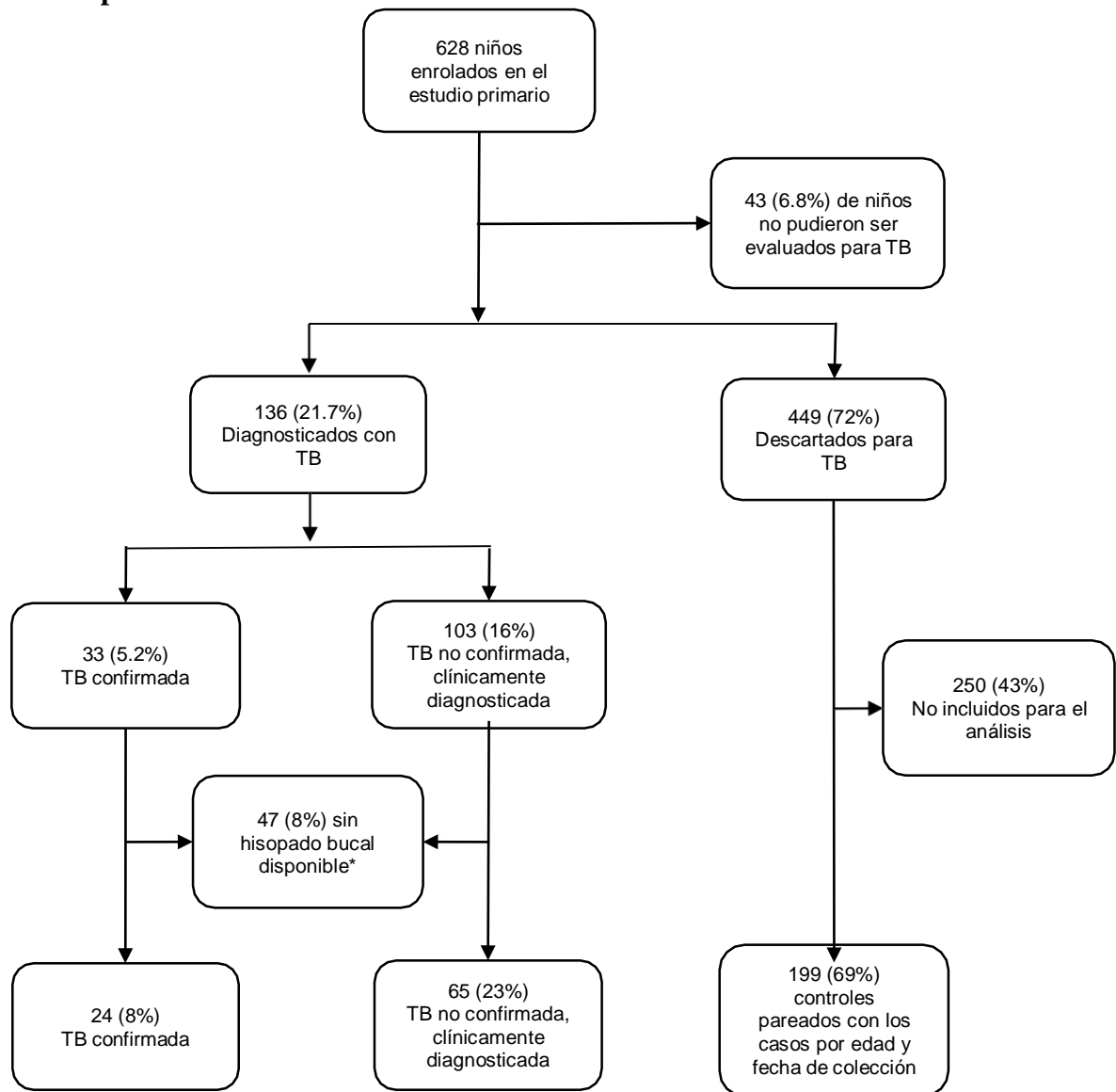
Los resultados de esta primera investigación fueron publicados previamente como primer autor en la revista *The Pediatric Infectious Disease Journal*, una revista ubicada en el primer cuartil (Q1) de impacto en las revistas indexadas (37).

3.5.1 Enrolamiento y muestra de estudio

De los 628 niños reclutados en la cohorte original, un total de 288 (46%) niños fueron incluidos para este análisis. Hubo 8.3% (24/288) de casos TB confirmados por cultivo, de los cuales 29% (7/24) fueron coloración ZN positivo en esputo. Los casos clínicamente diagnosticados (no confirmados por cultivo microbiológico representaron el 23% (65/288). Finalmente el 69% (199/288) fueron los controles (ver figura 3).

Las niñas representaron el 49% (140/288) y la mediana de la edad en años fue 5.7 (IQR 2.8-9.65). En 49% (140/288) de los niños el hisopado bucal fue colectado usando el EasiCollect y en el 51% (148/288) se usó el Omniswab. En relación al resultado previo por PPD, 27% (75/275) tuvieron un resultado ≥ 10 mm y la coloración ZN en las muestras de esputo fue positivo en 2.5% (7/286) de los niños. Ningún niño tuvo antes un resultado positivo a VIH, de acuerdo a lo reportado por su cuidador (Tabla 4).

Figura 3. Flujograma de los niños reclutados e incluidos en el estudio de hisopados bucales



* Las muestras bucales de algunos casos de TB fueron usados en experimentos piloto y por tanto no estuvieron disponibles para el análisis

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los niños menores de 15 años de edad (N=288)

Variable	Casos (TB no						
	Todos los niños n (%)‡	Casos (TB-Confirmados) n (%)		confirmado, clínicamente diagnosticado) n (%)		Controles sintomáticos n (%)	
		Easicollect	Omniswab	Easicollect	Omniswab	Easicollect	Omniswab
	n = 288	n=13	n=11	n=42	n=23	n=85	n=114
Grupo de edad (años)							
0-4	124 (43)	5 (63)	3 (37)	20 (59)	14 (41)	24 (29)	58 (71)
5-9	104 (36)	4 (57)	3 (43)	13 (65)	7 (35)	39 (51)	38 (49)
10-14	60 (21)	4 (44)	5 (56)	9 (82)	2 (18)	22 (55)	18 (45)
Sexo							
Mujer	140 (49)	5 (42)	7 (58)	26 (66)	13 (34)	43 (48)	46 (52)
Hombre	148 (51)	8 (67)	4 (33)	16 (62)	10 (38)	42 (38)	68 (62)
Desnutrición**							
Si	6 (2)	1 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	3 (100)	0 (0)

No	282 (98)	12 (52)	11 (48)	40 (63)	23 (37)	82 (42)	114 (58)
Habilidad para expectorar espontáneamente esputo, (286/288)*							
Si	122 (43)	4 (31)	9 (69)	17 (63)	10 (37)	38 (46)	44 (54)
No	164 (57)	9 (82)	2 (18)	24 (65)	13 (35)	47 (41)	69 (59)
Prueba en piel de Tuberculina, PPD (≥ 10 mm), (275/288)*							
Positivo	75 (27)	10 (67)	5 (33)	25 (78)	7 (22)	14 (50)	14 (50)
Negativo	200 (73)	0 (0)	2 (100)	15 (52)	14 (48)	69 (41)	100 (59)
Cavidades en rayos X de tórax (287/288)*							
Si	6 (2.1)	2 (33)	4 (67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No	281 (97.9)	11 (61)	7 (39)	42 (65)	23 (35)	85 (43)	113 (57)
Resultado de tinción Ziehl Neelsen (286/288)*							
Positivo	7 (2.5)	2 (29)	5 (71)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Negativo	279 (97.5)	11 (65)	6 (35)	41 (64)	23 (36)	85 (43)	113 (57)
Volumen inicial para extracción de ADN***							
Omniswab 0.25 mL	51 (34)	--	1 (100)	--	2 (100)	--	48 (100)

Omniswab 0.5 mL	97 (66)	--	10 (100)	--	21 (100)	--	66 (100)
EasiCollect, 3 piezas de tarjeta							
	18 (13)	1 (100)	--	2 (100)	--	15 (100)	--
EasiCollect, toda la tarjeta	122 (87)	12 (100)	--	40 (100)	--	70 (100)	--

*Debido a los datos perdidos, los denominadores no suman el total de la N.

** En los niños <5 años de edad, desnutrición fue definida como menor a -2DS en el z-score del peso para la edad; en niños ≥ 5 años de edad, desnutrición fue definido como menor a -2DS en el z-score de BMI para la edad, de acuerdo las guías de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

***Los dispositivos Omniswab u EasiCollect no fueron usados simultáneamente en algún niño. Por ello los porcentajes en la tabla están calculados para cada dispositivo.

‡Los porcentajes para las variables mostradas están siendo expresados en columnas

Abreviación: TB, tuberculosis

3.5.2 Análisis de sensibilidad y especificidad

La sensibilidad para los casos TB confirmados fue de 21% (5/24, IC95%: 7%-41%); al compararlo con la sensibilidad de 4.6% (3/65, IC95%: 1%-13%) de los casos de tuberculosis definidos clínicamente, se encontraron diferencias significativas ($p=0.018$). Sin embargo, luego de comparar las sensibilidades de los mismos casos confirmados por cultivo con la sensibilidad de 9% (8/89, IC95% = 4%-17%) de cualquier tipo de definición de caso (definición clínica o bacteriológica), no se encontraron diferencias significativas entre ellas ($p=0.103$). La especificidad de la PCR en tiempo real resultó en 99% (197/199; IC 95% = 96%-100%). La tabla 5 y 6 muestran el análisis de sensibilidad diagnóstica en las definiciones de caso empleadas estratificado por el tipo de dispositivo para la colección de hisopado bucal usado (EasiCollect o Omniswab). Allí encontramos en el grupo de tuberculosis confirmada, que la sensibilidad para el Omniswab (36%, 4/11) fue superior al del EasiCollect (7.7%, 1/13), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ellas ($p=0.085$). Finalmente, el uso de volúmenes menores de muestra inicial en las extracciones de ADN de *M. tuberculosis*, no parece afectar las sensibilidades de la prueba (ver tabla 7).

3.5.3 Análisis binomial

Factores asociados con la detección de *M. tuberculosis* de los hisopados bucales de niños con TB confirmada

Dentro de los casos confirmados por cultivo de TB, la tinción ZN+ estuvo asociada a un resultado positivo por qPCR (PR=9.7, IC 95% = 1.3-72; $p=0.03$).

En esta variable se encontró una amplia variación de sensibilidad entre los niños con una coloración ZN+ y ZN-. Las sensibilidades fueron mayores entre los niños con tinción ZN positivo (4/7=57%; IC 95% = 19%-90%) versus ZN negativo (1/17=5.9%; IC 95% = 0%-29%, p=0.005). Otras variables asociadas positivamente a un resultado positivo de RT-PCR fueron la presencia de cavidades en la radiografía de tórax (PR=4.5, IC95% 0.97-21; p=0.05) y la habilidad para expectorar el esputo de forma espontánea (5/13 para niños que pudieron producir esputo vs. 0/11 para niños que no pudieron producir esputo; p = 0.04). Dentro de las variables que no estuvieron asociadas a un resultado positivo de PCR se encontraron a la edad, el tipo de dispositivo usado para la colección de hisopado bucal, sexo, número de días con tos, fiebre o fatiga al momento de la presentación a la entrevista (ver Tabla 8).

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR en tiempo real en niños menores de 15 años según definición de caso

	VP	FP	FN	VN	Sensibilidad (IC95%)	Especificidad (IC95%)
TB confirmado	5	2	19	197	21% (7-42)	99% (96-100)
TB clínico	3		62		4.6% (1-13)	
TB confirmado / Tb clínico	8		81		9% (4-17)	

Abreviaturas: VP = verdadero positivo; FP = falso positivo; FN = falso

negativo; VN = Verdadero negativo

Tabla 6. Sensibilidad de la detección de DNA de *M. tuberculosis* usando qPCR, global y por categorías

	TB-confirmados (n=24)						TB no confirmado, clínicamente diagnosticado (n=65)					
	Total		EasiCollect		Omniswab		Total		EasiCollect		Omniswab	
	Sensibilidad		Sensibilidad		Sensibilidad		Sensibilidad		Sensibilidad		Sensibilidad	
	n/N	(IC 95%)*	n/N	(IC 95%)*	n/N	(IC 95%)*	n/N	(IC 95%)*	n/N	(IC 95%)*	n/N	(IC 95%)*
Total	5/24	21 (7-42)	1/13	7.7 (0-36)	4/11	36 (11-69)	3/65	4.6 (1-13)	2/42	4.8 (1-16)	1/23	4.3 (0-22)
Todos los niños (años)												
0-4	0/8	0 (0-37)	0/5	0 (0-52)	0/3	0 (0-70)	1/34	2.9 (0-15)	0/20	0 (0-17)	1/14	7.1 (0-33)
5-9	1/7	14 (0-58)	0/4	0 (0-60)	1/3	33 (1-91)	2/20	10 (1-32)	2/13	15 (2-45)	0/7	0 (0-41)
10-14	4/9	44 (14-79)	1/4	25 (1-81)	3/5	60.0 (15-95)	0/11	0 (0-28)	0/9	0 (0-34)	0/2	0 (0-84)
Sexo												
Mujeres	4/12	33 (10-65)	1/5	20 (1-72)	3/7	43 (10-82)	2/39	5.1 (1-17)	1/26	3.8 (0-20)	1/13	7.7 (0-36)

Hombres												
	1/12	8.3 (0-38)	0/8	0 (0-37)	1/4	25 (1-81)	1/26	3.8 (0-20)	1/16	6.2 (0-30)	0/10	0 (0-31)
Desnutrición***												
Si	0/1	0 (0-98)	0/1	0 (0-98)	0/0	--	0/2	0 (0-84)	0/2	0 (0-84)	0/0	--
No	5/23	22 (7-44)	1/12	8.3 (0-38)	4/11	36 (11/69)	3/63	4.8 (1-13)	2/40	5 (1-17)	1/23	4.3 (0-22)
Habilidad para expectorar espontáneamente esputo**												
Si	5/13	38 (14-68)	1/4	25 (1-81)	4/9	44 (14-79)	1/27	3.7 (0-19)	1/17	5.9 (0-29)	0/10	0 (0-31)
No	0/11	0 (0-28)	0/9	0 (0-34)	0/2	0 (0-84)	2/37	5.4 (1-18)	1/24	4.2 (0-21)	1/13	7.7 (0-36)
Prueba en piel de Tuberculina, PPD (≥ 10 mm)**												
Positivo												
	0/15	0 (0-22)	0/10	0 (0-31)	0/5	0 (0-52)	3/32	9.3 (2-25)	2/25	8.0 (1-26)	1/7	14 (0-58)
Negativo												
	1/2	50 (1-99)	0/0	--	1/2	50 (1-99)	0/29	0 (0-12)	0/15	0 (0-22)	0/14	0 (0-23)
Cavidades en rayos X de tórax												
Si	3/6	50 (12-88)	1/2	50 (1-99)	2/4	50 (68-93)	0/0	--	0/0	--	0/0	--

No	2/18	11 (1-35)	0/11	0 (0-28)	2/7	29 (4-71)	3/65	4.6 (1-13)	2/42	4.8 (1-16)	1/23	4.4 (0-22)
Resultado de tinción Ziehl Neelsen												
Positivo												
	4/7	57 (18-90)	1/2	50 (1-99)	3/5	60 (15-95)	--	--	--	--	--	--
Negativo												
	1/17	5.9 (0-29)	0/11	0 (0-28)	1/6	17 (0-64)	--	--	--	--	--	--

* CI = Intervalo de confianza exacto

**Debido a los datos perdidos, los denominadores no suman el total de la N.

** En los niños <5 años de edad, desnutrición fue definida como menor a -2DS en el z-score del peso para la edad; en niños \geq 5 años de edad, desnutrición fue definido como menor a -2DS en el z-score de BMI para la edad, de acuerdo las guías de crecimiento de la OMS.

Tabla 7. Sensibilidad de la detección de DNA de *M. tuberculosis* usando qPCR, por volumen inicial de muestra

	TB no confirmado,					
	TB-confirmado		clínicamente diagnosticado		Controles sintomáticos	
	(n=24)		(n=65)		(n=199)	
	Sensibilidad		Sensibilidad		Especificidad	
	n/N	(IC95%)*	n/N	(IC95%)*	n/N	(IC95%)*
Volumen inicial de muestra para extracción de ADN						
Omniswab 0.25 mL	1/1	100 (0-100)	0/2	0 (0-84)	0/48	100 (93-100)
Omniswab 0.5 mL	3/10	30 (7-65)	1/21	4.8 (0-24)	2/66	97 (89-100)
EasiCollect, 3 piezas de tarjeta						
	0/1	0 (0-98)	0/2	0 (0-84)	0/15	100 (78-100)
EasiCollect, toda la tarjeta	1/12	8.3 (0-38)	2/40	5 (1-17)	0/70	100 (95-100)

* IC = Intervalo de confianza exacto. Abreviación: TB, tuberculosis

Tabla 8. Análisis bivariado de factores asociados a la detección de *Mycobacterium tuberculosis* de muestras bucales en niños con tuberculosis confirmada (N=24)

	TB confirmada		RP*	IC 95%	p
	Si (n=5) n (%)	No (n=19) n (%)			
Edad (años)					
0-9	1 (7)	14 (93)	Ref.		
10-14	4 (44)	5 (56)	6.7	0.9-51	0.07
Método de colección oral					
EasiCollect	1 (8)	12 (92)	Ref.		
Omniswab	4 (36)	7 (64)	4.7	0.6-36	0.14
Sexo					
Mujer	4 (33)	8 (67)	Ref.		
Hombre	1 (8)	11 (92)	0.25	0.03-1.9	0.18
Resultado de tinción Ziehl Neelsen					
Negativo	1 (6)	16 (94)	Ref.		
Positivo	4 (57)	3 (43)	9.7	1.31 - 72	0.03
Cavidades en rayos X de tórax					
No	2 (11)	16 (89)	Ref.		
Si	3 (50)	3 (50)	4.5	0.97 - 21	0.05
Días con tos al presentarse en el establecimiento de salud	18 (6.7)***	34.6 (37.1)***	0.98	0.95 - 1.02	0.38
Días con fatiga, cansancio o sueño	1.4 (3.1)***	3.8 (7.4)***	0.93	0.73 - 1.2	0.53
Días con fiebre al presentarse en el establecimiento de salud**	0.2 (0.7)***	0.4 (0.9)***	1.25	0.63 - 2.5	0.52

*RP = Razón de prevalencia, calculado por regresión binomial

**N=23

Abreviaciones: TB, tuberculosis; IC, intervalo de confianza exacto

3.6 Discusión

En este análisis se pudo encontrar ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de hisopados orales colectadas tanto con el Omniswab o EasiCollect en niños menores de 15 años. Según el tipo de dispositivo para coleccionar las muestras orales, obtuvimos que la sensibilidad del Omniswab fue superior a la del EasiCollect en la detección de ADN de MTB, sin embargo, no hubo diferencias significativas.

En cuanto a la sensibilidad global de la prueba PCR en los hisopados orales de niños fue de 20% en los casos con diagnóstico de TB confirmada por cultivo. A la fecha no se han encontrado estudios que evalúen la sensibilidad de una prueba molecular en hisopados orales en niños. Como aproximación, el grupo de investigación del estudio primario de la tesis reportó sensibilidades del Xpert frente al cultivo de TB en esputo usando muestras orales de adultos obteniendo una sensibilidad de 45% (66). Se hipotetiza que la diferencia de sensibilidades encontradas en adultos versus niños obedece a las mismas encontradas en el cultivo microbiológico, donde la paucibacilaridad y mayor probabilidad de tuberculosis extra pulmonar limita la cantidad de bacterias en las vías aéreas y por ende limita la cantidad de ADN en la mucosa oral que podamos encontrar. Además, habiendo demostrado ADN de MTB detectable en la mucosa oral, no sabemos aún si los bacilos del que provino el ADN pudieron adherirse específicamente o no específicamente a la pared de la mucosa oral lo que explicaría en parte estas diferencias de sensibilidades, esta respuesta sería clave para futuras optimizaciones de pruebas orales en niños.

Se encontraron ligeras diferencias entre los métodos de colección de la muestra bucal, así, se obtuvo una mayor sensibilidad cuando se usó el Omniswab en comparación al EasiCollect. Aun así, esta diferencia necesita ser más explorada. Una de las explicaciones a las posibles diferencias es que el ADN de MTB se libera mejor en un medio líquido (Omniswab) que en una tarjeta que adsorbe al ADN como el EasiCollect. Se ha reportado que los hisopados bajo la tecnología *flocked swab*, donde las fibras cran cientos de miles puntos de contacto, son superiores al omniswab en la recuperación y liberación del ADN de MTB en muestras de adultos (58), lo cual podría evaluarse en las muestras orales de niños en futuros estudios. A pesar de todo lo anterior, no se ha encontrado estudios en niños o adultos que comparen estos métodos de colección oral para la extracción y detección de ADN de *M. tuberculosis*.

De acuerdo al criterio clínico usado como definición de caso se obtuvo una menor sensibilidad con respecto a la definición de TB confirmada por cultivo. Los resultados de la sensibilidad mostrados bajo el criterio clínico resulta muy interesante de estudiar en el futuro para evaluar la utilidad de una prueba molecular en muestras orales de niños con TB clínicamente diagnosticadas. El criterio clínico fue incluido debido a que en la práctica clínica es el criterio predominante ante la falta de pruebas con alta sensibilidad y a la dependencia de confirmar un caso por medio de un cultivo el cual en los niños tiene limitaciones; a pesar de que el criterio clínico pueda tener algunas limitaciones que le otorgarían variabilidad de interpretaciones, éstas son reducidas al usar criterios estandarizados como los usados en este estudio (60). En los niños, la sensibilidad del cultivo de TB en esputo es inferior a 40% (12-14) donde la

baja carga bacilar juega un rol determinante en la detección del cultivo. Del mismo modo, el ADN disponible en fuentes no invasivas como la mucosa oral puede estar disminuido por lo que una prueba molecular tendría dificultades para la detección a pesar de que clínicamente podamos estar frente a un caso de Tuberculosis. Una aproximación a esta comparación lo encontramos en un reporte previo del grupo de investigación del estudio principal donde se usaron las otras muestras como heces, donde al usar el GeneXpert TB se tuvo una baja sensibilidad (1.2%) usando también el diagnóstico clínico en la definición de caso (16), así también la sensibilidad del ensayo Xpert-ultra usando este criterio fue menor a 5% en muestras nasofaríngeas de niños (67).

Dentro de los factores asociados a la positividad de un resultado PCR en tiempo real bajo una definición de casos por confirmación de cultivo para TB, se encontró que un resultado ZN positivo estuvo fuertemente asociado. Cuando usamos cualquier definición de caso, además del ZN positivo, encontramos también al cultivo TB positivo asociado a un resultado positivo de PCR en tiempo real. Estos resultados son consistentes con otras evaluaciones en niños usando diferentes muestras biológicas (16, 35, 67, 68). Sin embargo, en muestras orales, no hemos encontrado análisis de factores asociados a la positividad de una prueba molecular.

La principal limitación fue la falta de seguimiento, sobre todo a los controles que tuvieron una prueba molecular positiva quienes probablemente pudieran desarrollar tuberculosis en el futuro o definirse finalmente como falsos positivos, sin embargo de darse el caso que los falsos positivos fueran realmente positivos, ello podría haber incrementado ligeramente la sensibilidad a un

máximo de 27% (7/26) en los casos confirmados, lo cual clínicamente aún no sería un incremento significativo a lo reportado sin seguimiento. Se ha reportado la existencia de falsos positivos en resultados de PCR en niños que formaron parte de controles sanos en estudios diagnósticos, evidenciando una mayor frecuencia de falsos positivos entre niños VIH positivo que VIH negativos (69). Lo último recalca la importancia en estudios de pruebas diagnósticas de tuberculosis en niños de incluir mejores grupos control que podrían incluir personas sanas con otras infecciones respiratorias distintas a las de tuberculosis.

Una segunda limitación de este análisis fue incluir diferentes cantidades de muestra inicial para iniciar la extracción de ADN tanto para el dispositivo Omniswab e EasiCollect. Las ligeras diferencias encontradas con estos métodos de colección de ADN debieran evaluarse en un ensayo considerando un protocolo fijo de cantidad de muestra inicial.

Debido a que los controles estuvieron emparejados con los casos, no se pudo evaluar los valores predictivos positivo o negativo debido a que los controles pareados no representaron a los controles reales de la población de niños incluidos.

La búsqueda de ADN de TB de fuentes no invasivas como las orales, orina y heces se ha venido incrementando con resultados prometedores (16, 20, 58, 66, 70, 71). En el caso de las muestras orales, no se han reportado aun estudios que incluyan niños. En muestras orales de adultos, es prometedor el hecho de encontrar mejor sensibilidad de una prueba molecular usando hisopados de lengua con los hisopos denominados “*flocked swabs*” (58). Para futuros estudios

en niños, además de elegir el método molecular a evaluar, resulta interesante optimizar la metodología de colección de muestras considerando a la muestra de hisopado de lengua como fuente prometedora así como el uso de “*flocked swabs*” como dispositivo más óptimo de colección de ADN de TB.

En conclusión, se reporta la presencia de ADN de MTB en muestras de hisopados bucales en niños menores de 15 años de edad. Pese a encontrar mayor sensibilidad usando el Omniswab, no encontramos diferencias significativas con el uso del EasiCollect, además se obtuvo una sensibilidad global de 20% de la prueba de PCR en tiempo real usando el cultivo líquido de MTB como referencia y un resultado ZN positivo estuvo asociado a un resultado positivo de PCR en tiempo real. Ante la carencia de estudios en muestras orales en niños, se considera que deben incluirse comparaciones con otras muestras orales no invasivas (lengua) y hacer uso de nuevos dispositivos de colección oral para determinar la utilidad de una muestra oral en el diagnóstico de MTB en niños menores de 15 años.

V. INVESTIGACIÓN 2: Nivel de asociación entre la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida y la tuberculosis pediátrica en niños entre 6 y 59 meses de edad

4.1 Justificación

Desde hace mucho tiempo conocemos que la leche materna es un factor protector para diferentes enfermedades; probablemente debido al contenido de sustancias antimicrobianas, componentes anti inflamatorios y factores que promueven el desarrollo inmune (Apéndice 1) (36, 72).

La OMS define a la lactancia materna exclusiva como la alimentación a un infante con leche materna sin alguna comida o bebida adicional incluida el agua, donde es permitido hacer uso de sales de rehidratación oral, gotas o jarabes de vitaminas, minerales o medicinas (73). La OMS recomienda la lactancia exclusiva desde la primera hora de vida hasta los 6 meses de edad para brindar la alimentación adecuada y protección contra infecciones (74). En el 2016, la encuesta demográfica y de salud familiar del Perú (ENDES) reportó que un 69.8% de niños y niñas menores de 6 meses de edad recibieron lactancia exclusiva, cifras superiores a la cobertura promedio de 39% reportada en países de ingresos medios/bajo en el mismo año (75). De acuerdo a la duración de lactancia exclusiva, la ENDES reportó ser mayor en las zonas rurales que en las urbanas (76). Asimismo, se evidenció una diferencia en la frecuencia de lactancia exclusiva según áreas de residencia, donde el área rural muestra históricamente prevalencias mayores al área urbana e incluso supera a la prevalencia histórica nacional que bordea el 70% (77). Es conocido que en los niños, la infección por tuberculosis tiene mayor

probabilidad de ser mortal si no es diagnosticada a tiempo lo cual ha sido reportado desde la era pre-antibiótica contra la TB donde una vez diagnosticada en menores de 6 meses de edad, aproximadamente el 55% de los infantes fallecía por tuberculosis (78). Ahora, a pesar de contar con algunas terapias disponibles, los menores de 5 años de edad continúan en riesgo de presentar una infección por TB mortal (79), donde se ha calculado que los niños que viven con adultos con TB poseen un riesgo 66% mayor a muerte que uno no expuesto (80).

Se ha estudiado el rol protector de la leche materna en las infecciones gastrointestinales y respiratorias. En los lactantes exclusivos de leche materna el riesgo de muerte por diarrea se reduce entre 14 a 24 veces (81). Entre los componentes más estudiados de la leche materna que se encuentran asociados a la protección contra infecciones gastrointestinales se encuentran los oligosacáridos de la leche humana (HMO) y la IgA secretoria.

En relación al efecto protector contra las enfermedades respiratorias, los patógenos virales y bacterianos más comunes que afectan el tracto respiratorio de infantes son el virus sincitial respiratorio (RSV) y la bacteria *Streptococcus pyogenes* (GAS, Streptococcus del grupo A) respectivamente. La leche materna confiere protección contra el RSV en cuanto a su incidencia y severidad. Una de las explicaciones biológicas en infantes con lactancia materna exclusiva, recae en el hallazgo de niveles mayores de IFN α en comparación con los que no reciben lactancia materna exclusiva (82). Esto sugiere que la protección contra el RSV es mediado por algún factor o factores contenidos en la leche materna que son transmitidas al bebé. El *Streptococcus*

pyogenes es la principal causa bacteriana de faringitis en niños a nivel de la comunidad (83), la leche materna brinda los anticuerpos que protegen contra organismos piogénicos encapsulados como este y otros como *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus* y *Pneumococcus* en los primeros meses de vida(84). Un estudio caso control sugirió un efecto protector de la lactancia materna en el riesgo de invasividad de *Streptococcus pneumoniae* en infantes de 2–11 meses de edad, los autores hipotetizaron que la transferencia pasiva de anticuerpos u otros componentes como la caseína podrían ser responsables de la protección (85).

Desde el punto de vista inmunológico, conocemos que la infección por tuberculosis causa la activación del sistema inmune, activando a moléculas responsables del señalamiento celular como las citocinas. Las citocinas ejercen la función de señalamiento celular para efectos biológicos en el sistema inmune y son producidas en gran parte por los linfocitos y macrófagos activados.

Los linfocitos T-helper son los que expresan CD4 y estos a su vez se dividen en los grupos Th1 y Th2. Las citocinas pueden ser divididas en 2 grupos, un grupo pro-inflamatorio (Th1) y otro anti-inflamatorio (Th2).

En la tuberculosis, la respuesta celular T CD4+ juega un rol importante en la resistencia de adquisición en el hospedero. El desbalance en la respuesta Th1/Th2 en sangre periférica está asociada al desarrollo de la tuberculosis (86, 87). Los pacientes con TB poseen mayor respuesta Th2 o un cociente Th2/Th1 mayor cuando es comparado con pacientes PPD negativo o con TB latente (88). Además, la severidad de la enfermedad está muy relacionada a

la respuesta Th1, donde a una menor respuesta Th1 le corresponde mayor severidad de la enfermedad (89, 90).

En el infante, las citocinas Th1 (IFN-gamma, IL-2) y Th2 (IL-4) se encuentran en niveles diferentes a las de un adulto, los infantes tienen niveles más altos de IL-2 y IL-4 pero menores niveles de IFN-gamma, esto da una predominancia en la modulación del sistema inmune por Th2. Además, los infantes tienen menor función de memoria efectora Th1 comparado al adulto (91). Esta ineficiencia de la respuesta Th1 en neonatos va cambiando progresivamente con la edad (92) donde la leche materna cumple un rol importante en la educación del sistema inmune al proveer señales que generan una apropiada respuesta y memoria inmunológica (93). Sumado a ello, se ha demostrado que los oligosacáridos de la leche humana (HMO) pueden alterar la respuesta inmune cambiando la respuesta de las células T a una producción balanceada de citocinas Th1/Th2 (94).

De acuerdo a lo anterior y pese al efecto protector de la leche materna en diferentes infecciones, existen vacíos cuando se investiga la asociación con la tuberculosis activa, a la fecha luego de realizar la búsqueda de estudios de asociación entre Lactancia materna y tuberculosis no se hallaron artículos relacionados a las palabras clave “tuberculosis” and “breastfeeding”, sólo se encontraron algunas recomendaciones de la lactancia ante un caso de tuberculosis). Sin embargo, en diferentes estudios preclínicos en modelos animales, se ha evaluado el potencial bactericida de proteínas de la leche materna como la IgA secretoria o del complejo HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells), siendo ésta última un complejo de

alfa lacto albúmina y ácido oleico derivado de la leche humana. En los estudios de la IgA secretoria, usando ratones como modelo animal, se demostró que la ingesta de IgA humana secretoria provocó la reducción en la carga bacteriana y el daño provocado en los pulmones (95), quedando demostrado en el análisis histopatológicos de pulmón una activación de macrófagos organizados en granulomas (96). En los estudios del complejo HAMLET, se ha demostrado un efecto bactericida contra el *M. tuberculosis*, además que potencia la actividad de antibióticos usados contra la tuberculosis y que puede ser activa contra tuberculosis en macrófagos de líneas celulares THP-1 (97). Así como su participación en revertir la resistencia a algunos antibióticos de primera y segunda línea contra *M. tuberculosis* cuando se usa a concentraciones sub-letales (97).

Creemos que al igual que con otras infecciones descritas, la leche materna podría ser un factor protector contra la tuberculosis activa apoyados también en que participa en la maduración del sistema inmunológico de los menores de 5 años que en general presentan una respuesta Th1 débil que les otorga una inmunosupresión relativa a la mycobacteria (98). La confirmación de esta hipótesis tendría un impacto positivo en la salud pública en la lucha contra la tuberculosis pediátrica a través de las recomendaciones que refuercen aún más la lactancia exclusiva. Esta segunda investigación analizará la asociación entre la lactancia exclusiva de seis meses y la tuberculosis activa en niños entre 6 y 59 meses de edad.

4.2 Pregunta de Investigación Principal

¿Cuál es el nivel de asociación entre la lactancia materna exclusiva durante los seis primeros meses de vida y la tuberculosis pediátrica en niños entre 6 y 59 meses de edad?

4.3 Hipótesis Secundarias

Se hipotetiza que en este estudio podemos estar frente a modificadores de efecto que se explorará en el análisis. Los posibles modificadores de efecto identificados a priori a explorar son las variables: madre siendo el caso índice de tuberculosis y la edad del niño en el momento del muestreo.

4.4 Materiales y Métodos

Esta segunda parte de la tesis doctoral también usa la información del estudio primario DETECT-niños que fue descrita en las secciones correspondientes en la investigación 1.

4.4.1 Diseño

El diseño general del estudio primario ya fue mencionado en el punto 3.4.1. Esta segunda investigación es un análisis secundario de datos del estudio primario DETECT-niños. El diseño de esta segunda investigación es de tipo prospectivo transversal sin seguimientos. Se usó información de todos los

niños entre 6 y 59 meses de edad de los niños enrolados en el estudio primario. Los datos del estudio provienen de historias clínicas y cuestionarios que fueron colectados como parte de los objetivos del estudio primario.

4.4.2 Población y diseño muestral

4.4.2.1 Población

La población de la segunda investigación está conformada por niños entre 6 y 59 meses de edad. Estos niños poseen síntomas de tuberculosis o han sido diagnosticados con la enfermedad pero que aún no han iniciado el tratamiento. Los participantes fueron enrolados en 49 centros de salud y hospitales pertenecientes a las direcciones de salud (DISA) II y DISA IV de Lima metropolitana. Las DISA tienen a su cargo los centros de salud y hospitales del ministerio de salud de forma descentralizada. Se eligieron estas DISA debido a que acumulan una de las mayores prevalencias e incidencias de tuberculosis en el Perú.

4.4.2.1.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión del estudio primario fueron detallados en la sección 3.4.2.1.1

4.4.2.1.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión del estudio primario fueron detallados en la sección 3.4.2.1.1

Adicionalmente, para el presente proyecto de tesis se incluyeron los siguientes criterios de exclusión:

- Niños igual o mayores a 5 años de edad. (Exclusión para análisis)
- Niños menores a 6 meses de edad (Exclusión para análisis)

4.4.3 Muestreo

4.4.3.1 Tipo de muestreo

El muestreo del estudio primario denominado DETECT fue consecutivo. La unidad de muestreo fue el participante. Los pacientes que acudieron a los establecimientos de salud de las DISAS II y IV de lima metropolitana fueron contactados por personal del estudio que estuvieron visitando constantemente los centros con apoyo del personal de la estrategia sanitaria nacional de prevención y control de la tuberculosis (ESNPCT). La búsqueda de potenciales participantes se hizo mediante la revisión de los libros de registros de los sintomáticos respiratorios y de los pacientes diagnosticados con tuberculosis cumpliendo los criterios de elegibilidad. El personal del centro de salud tuvo el primer contacto con el participante potencial quien luego fue contactado con el personal del estudio DETECT.

4.4.4 Procedimientos del estudio

Al identificar un potencial participante, primero el personal de campo ofreció al participante y al padre o cuidador información impresa con

imágenes sobre el estudio y sus objetivos para luego invitarlos a participar. Luego de aceptar, se le describió de forma completa el estudio y sus riesgos/beneficios para la obtención de su consentimiento/asentimiento informado.

4.4.4.1 Recolección de datos

Los datos fueron colectados en los formatos de reporte de casos (CRF, por sus siglas en inglés) usados como instrumento. La institución encargada de la ejecución del estudio fue Socios En Salud – Sucursal Perú. Socios En Salud posee amplia experiencia en investigaciones relacionadas a la tuberculosis para la aplicación de los instrumentos (99). Todo el personal del estudio incluido reclutadores, digitadores, laboratorio e investigadores fue entrenado en temas de buenas prácticas clínicas y principios éticos de los estudios de investigación antes de la ejecución del estudio y también durante la ejecución del estudio. Además, el personal de reclutamiento del estudio fue entrenado en los procedimientos de aplicación de consentimiento informado, codificación de participantes, colección de muestras, transporte de muestras, aplicación electrónica en celulares de los CRFs que contienen los cuestionarios y envío de información de datos de reclutamiento por un sistema informático de la institución denominado SEIS (Sistemas de Información de Socios en Salud). Los datos de laboratorio como los resultados de los cultivos microbiológicos fueron también recolectados del sistema SEIS, así como la definición de un caso basado en el diagnóstico

clínico que fue descrito en los cuestionarios. El personal que aplicó los cuestionarios es un

4.4.4.1.1 Cuestionarios

En el estudio primario para los niños se realizaron 21 cuestionarios entre los que figuran: Cuestionarios de antropometría, aplicación de PPD, BK y cultivo, datos del padre o apoderado, detalles del caso índice, disposición de repetir el procedimiento, escalas de exposición detallada, examen físico, historia de TB, historia médica, inseguridad alimentaria, lectura de PPD, nivel de comodidad, prueba de embarazo, prueba de la cuerda encapsulada (es un CRF usado para detallar la percepción en los niños al tragar una capsula adherida a una cuerda, usado para el análisis microbiológico de *M. tuberculosis*), revisión de historia clínica, revisión de radiografía de tórax, síntomas, sociodemográfico, valoración de dolor a la prueba.

Cada uno contuvo preguntas cortas y puntuales donde se colectaron los datos. Todos estos datos fueron colectados por el personal del estudio por una entrevista al participante o por extracción de datos de registros físicos. Estos datos fueron almacenados inmediatamente en un teléfono móvil que poseía una aplicación creada específicamente para el estudio el cual organiza los datos de participantes y almacena la información para ser usada por los supervisores de proyecto y personal de otras áreas como el laboratorio, para un seguimiento en tiempo real de cuantos potenciales participantes fueron reclutados y poder organizar el trabajo de esas otras áreas. La mayoría de las preguntas eran de opciones múltiples y unas pocas fueron observaciones que

el entrevistador anotaba adicionalmente. El tiempo aproximado de aplicación de la encuesta estuvo en el rango de 45 minutos a hora y media. Las preguntas referentes a la lactancia exclusiva en los niños se encuentran en el cuestionario de inseguridad alimentaria (anexo 2 “CRF Inseguridad alimentaria en el domicilio – niños”).

4.4.4.1.2 Muestras biológicas

Todos los tipos de muestra colectadas del estudio primario fueron detallados en la sección 3.4.4.1.2.

Para la definición de un caso confirmado de tuberculosis se usaron los resultados de los cultivos a las muestras de esputo o de aspirados gástricos. Para este procedimiento, el laboratorio de Socios En Salud cuenta con un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 donde se realizan los procedimientos del cultivo bajo estrictas normas de bioseguridad y de control de calidad donde se usan controles internos de cultivo y de procedimientos rutinarios, además cuenta con entrenamientos constantes en su personal.

4.4.4.2 Procesamiento de muestras biológicas

Aspirados gástricos. Fueron colectados por medio de un procedimiento especial llevado a cabo en los centro de salud u hospitales que involucró introducir una sonda nasogástrica por la boca o nariz hasta llegar al estómago del participante. Este procedimiento se usa para recuperar el

esputo que fue tosido y tragado. Para el estudio se solicitaron los aspirados gástricos muy temprano en la mañana tratando de recolectarlos. El contenido del aspirado gástrico se lleva a un recipiente de colección estéril. En el mismo lugar de colección se midió el pH antes del transporte. El transporte de la muestra se realizó en cadena de frío entre 2°C – 8°C hacia el laboratorio de Socios En Salud.

Espuito. Este tipo de muestra fue auto-colectada por los participantes en caso lo lograran realizar, de lo contrario fue inducida por el personal de salud. En el caso de la auto-colección, previamente se les indicó que la muestra se extrae del contenido del fondo de la garganta mediante una expectoración y no una emisión de saliva solamente, para ello se les entregó un recipiente de plástico de 100mL estéril de boca ancha con tapa rosca. Para la inducción del esputo el participante se encontró en ayunas. Las muestras colectadas fueron mantenidas luego de la colección, en cadena de frío entre 2°C - 8°C dentro del lugar de colección que pudo ser el centro de salud, hospital o domicilio del participante hasta su transporte hacia el laboratorio de Socios En Salud.

Re-codificación de muestras

Las muestras en el laboratorio fueron recepcionadas, registradas, codificadas con identificaciones independientes del código asignado del

participante y finalmente alicuotadas para su almacenamiento o procesadas inmediatamente para los estudios microbiológicos.

Las muestras de esputo y aspirado gástrico pasaron por un proceso de descontaminación usando un protocolo estándar descrito previamente en la investigación 1, donde finalmente fueron resuspendidos en 1.5mL de buffer. 500 µL de este volumen fue usado para el cultivo en BD BACTEC™ MGIT™ (Becton and Dickinson, USA) y 1mL fue almacenado a -80°C hasta su extracción de ADN.

Cultivo bacteriológico de las muestras alicuotadas.

El análisis bacteriológico se realizó inmediatamente luego de la recepción de las muestras de esputo y aspirado gástrico. Cada muestra cruda, inicialmente es teñida por la técnica de Ziehl-Nielsen (ZN), luego las muestras se descontaminaron siguiendo el método de NALC-NAOH y se concentraron por centrifugación entre 2000g y 3000g durante 20 minutos. Los sedimentos que resultaron se neutralizaron en un tampón fosfato y se resuspendió finalmente en 1.5mL de tampón fosfato. 500 µL de esta suspensión se inoculó en el sistema de cultivo automatizado BD-BACTEC MGIT o se sembró en el medio de cultivo clásico de Lowenstein-Jensen. Los tubos del sistema BD-BACTEC MGIT se colocaron en el equipo que realiza la lectura automatizada del crecimiento bacteriano por el principio de consumo de oxígeno, el cual es evidenciado por una señal eléctrica

enviada al equipo que es interpretado como crecimiento positivo o negativo al cabo de 7 – 13 días. En el caso del medio Lowenstein-Jensen se esperó la formación de colonias típicas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un máximo de 28 días. Estos cultivos solo muestran crecimiento de forma cualitativa que podría ser causado por bacterias diferentes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, por ello luego de obtener un crecimiento positivo, se realizó la confirmación bacteriológica, primero tiñéndola bajo la coloración de ZN para identificación de bacilos alcohol resistentes sugestivos de *M. tuberculosis* y de resultar positivo, pasó por una confirmación con una prueba inmunocromatográfica que detecta al antígeno MTP 64 específico de este complejo bacteriano y luego de ello el cultivo es clasificado como perteneciente o no a este complejo.

4.4.5 Variables de estudio

4.4.5.1 Variable desenlace (dependiente) y co-variable principal (independiente)

Variable dependiente: Diagnóstico de tuberculosis pulmonar activa

Definición conceptual: Es el resultado de haber desarrollado la tuberculosis que ha sido previamente confirmada por el cultivo microbiológico considerada el gold estándar.

Definición operacional: Conociendo que en niños, la colección de esputo es complicada y la sensibilidad baja, se usó como definición

de un caso de TB, además del cultivo bacteriológico, al diagnóstico clínico, el cual hizo se basó en la sintomatología compatible con TB, y resultados de PPD o IGRA y radiografías de tórax.

Medición: La medición de esta variable se dio en base al resultado del cultivo bacteriológico o al criterio clínico dado por expertos neumólogos pediatras.

Tipo de variable: Variable categórica, escala nominal.

Instrumento de medición: Resultados de laboratorio, examen clínico consignado en historia clínica, radiografías de tórax frontal y lateral, resultado de pruebas de PPD o IGRA.

Validez de la medición: El criterio clínico usado en el estudio por los expertos neumólogos pediatras, quienes hacen uso de la definición base de caso de tuberculosis en niños conocido como puntaje de Stegen- Toledo, bajo algunas actualizaciones (60, 100). Por otro lado, el criterio microbiológico para la definición de caso de TB, tiene una validez de acuerdo a los estándares que se rigen por su manual de operaciones y en la inclusión de controles en cada procedimiento.

Recategorizaciones: no se realizó.

Formato final de la variable y valores: Se usará el dato en forma categórica con los valores SI/NO para tuberculosis pulmonar activa.

Variable independiente principal: Lactancia materna exclusiva.

La variable independiente principal es la lactancia materna exclusiva medida originalmente en forma numérica. Esta variable fue medida usando tres preguntas de acuerdo a los cuestionarios suministrados al cuidador del niño (anexo 2 “CRF Inseguridad alimentaria en el domicilio – niños”).

Definición conceptual: Única fuente de alimentación de un infante durante la primera hora y los 6 meses de vida consistente en la leche de la madre donde está permitido el uso de sales de rehidratación oral, gotas o jarabes (minerales o medicamentos).

Definición operacional: alimentación exclusiva (sin otros alimentos o líquidos) del infante a base de leche materna en los primeros 180 días de vida.

Medición: Mediante tres preguntas en el cuestionario de inseguridad alimentaria en el domicilio formuladas en forma retrospectiva: ¿fue amamantado el niño alguna vez?, ¿Hasta qué edad fue amamantado su niño? y ¿Hasta qué edad amamantó al niño exclusivamente (sin otros alimentos o líquidos)?.

Las tres preguntas relacionadas a lactancia materna exclusiva se incluyeron en el cuestionario en base a la definición de la OMS (73). El cuestionario de inseguridad alimentaria tuvo la intención de mostrar en el estudio primario las condiciones de alimentación en las que los niños se encontraban en el hogar. Como parte de ello, se incluyeron las preguntas relacionadas a la lactancia que

describirían la alimentación inicial de los infantes. En relación a las preguntas de lactancia materna, las dos primeras preguntas referidas a inicio y duración de lactancia han sido también usadas en estudios retrospectivos y reportaron una validez adecuada hasta los 3 años de edad (101, 102). La tercera pregunta incluyó la palabra “exclusivamente”, lo que usualmente no es incluida en la formulación de LME en otros estudios. Usualmente, la duración de lactancia exclusiva es medida como la edad en la que hay introducción de algún sólido o semisólido diferente a la leche materna o introducción de leche de fórmula y es válida medirla retrospectivamente con esta formulación cuando los niños son menores de 1 año (102-105). En el apéndice 3 del anexo 4 se ha resumido diferentes estudios en revistas de alto impacto que miden la LME de forma retrospectiva y cómo formulan sus preguntas relacionadas a la lactancia exclusiva.

Tipo de variable: Variable categórica, escala nominal.

Instrumento de medición: Cuestionario

Validez de la medición: Las 3 preguntas formuladas para el estudio exploratorio no fueron validadas dentro del estudio. Se formularon en base a la definición de LME dada por OMS. Si bien las 3 preguntas no fueron validadas, todas las preguntas fueron revisadas previo al inicio del estudio por el equipo de campo y entrevistadores luego de su entrenamiento. El entrevistador que administró el cuestionario fue un (a) profesional

Licenciado (a) o técnico (a) de Enfermería en su mayoría de sexo femenino contratado (a) por el estudio Detect. Estas personas, además de contar con experiencia trabajando con pacientes con TB (en el campo asistencial o de investigación), no estuvieron culturalmente muy alejados de la población de estudio (viven o han vivido en zonas cercanas a la población de estudio, estuvieron en constante contacto con la población a través de los centros de salud u hospitales o pacientes que atendieron alguna vez); además, el personal entrevistador, fue entrenado en buenas prácticas clínicas e integridad científica además del entrenamiento propio del protocolo, el cual incluyó la revisión en la formulación de cada una de las preguntas para asegurar su comprensión para la administración correcta de los cuestionarios y tomas de muestras biológicas (comunicación escrita recibida por la investigadora principal del estudio).

Recategorizaciones: Debido a que el dato original es numérico discreto y que la definición de lactancia exclusiva se da hasta 6 meses, se usó una recategorización considerando < 6 meses de lactancia exclusiva y ≥ 6 meses.

Formato final de la variable y valores: Variable dicotómica en análisis principal: < 6 meses de lactancia exclusiva y ≥ 6 meses de lactancia exclusiva.

4.4.5.2 Otras co-variables relevantes

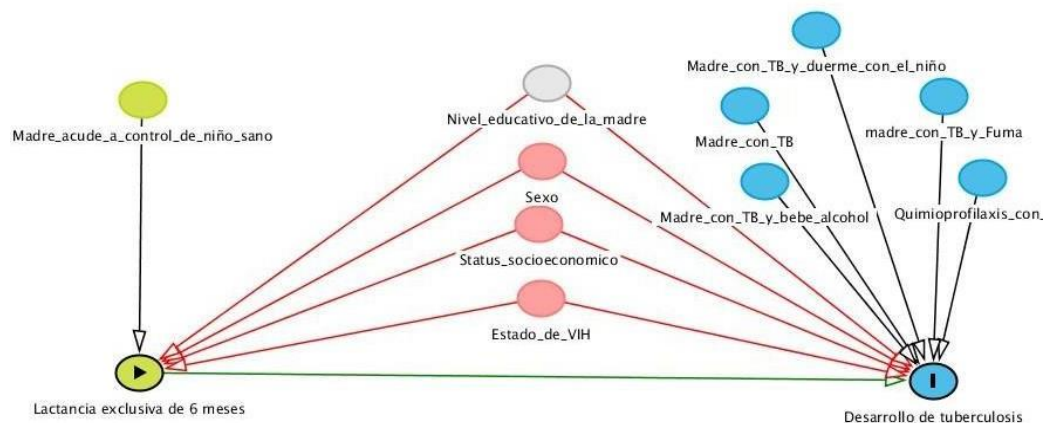
Confusores a evaluar:

- Sexo
- Índice socioeconómico
- Madre siendo el caso índice de TB
- Caso índice comparte cama con el niño
- Caso índice fuma
- Caso índice bebe alcohol
- Terapia preventiva con isoniazida en el niño

Para esas variables se evaluará su posible rol confusor mediante un análisis binomial con la variable diagnóstico de tuberculosis pulmonar activa.

Además se explorará el rol de modificador de efecto de la variable Madre como caso índice de TB por medio de análisis de interacción, así como también el posible efecto de la edad analizando subgrupos de los niños entre 6 a 23 meses de edad y entre 24 a 59 meses de edad.

4.4.5.3 Gráfico acíclico dirigido (DAG)



4.4.6 Procesamiento y análisis estadístico

Las variables del estudio fueron descritas en el análisis univariado. Se evaluaron los confusores en la asociación entre las variables desenlace y exposición con la prueba de χ^2 para variables categóricas o con una prueba estadística para variables cuantitativas, evaluando previamente los supuestos y considerando un corte con un valor de $P \leq 0.2$. El estudio no pudo coleccionar variables importantes conocidas por ser posibles variables confusoras como el nivel educativo de la madre o el estado de VIH. Sin embargo, los instrumentos recogieron información sobre las características de cada hogar y esta información fue usada para crear una aproximación al estatus socioeconómico denominada en este estudio “índice socioeconómico” que es un método muy usado de aproximación (106). Este índice fue calculado mediante un análisis de componentes principales (PCA) basado en 12 ítems medidos en forma dicotómica (Apéndice 2), donde se eligió al primer componente principal (PC1), el cual obtuvo el Eigenvalue más alto explicando el 26.4% de la varianza total; esta variable fue usada en forma continua como confusor a priori. Otros confusores a evaluar fueron el sexo, el tener contacto con la madre con TB, vacunación con BCG. La variable lactancia materna exclusiva fue evaluada de forma dicotómica.

El análisis multivariado incluyó un modelo GLM de distribución binomial con link log y varianza robusta; cuando no se encontró convergencia, se

usó una distribución de Poisson para estimar la razón de prevalencias. Además, se exploró la presencia de dos modificadores de efecto. En la primera exploración de modificador de efecto, se estratificó por la variable “madre siendo el caso índice”, el cual es un proxy a la carga de exposición por tuberculosis del niño. El segundo modificador de efecto a explorar fue la edad del niño al momento del muestreo; a la fecha no se encontró información sobre un efecto modificador de la edad en la asociación entre lactancia materna y tuberculosis. A pesar que algunos estudios no han encontrado posible modificación de efecto de la edad en la protección de la leche materna contra infecciones respiratorias (107), para este estudio se incluye en el análisis un posible rol modificador basado en el hecho que la respuesta inmune madura en relación a la edad. En el análisis, la edad de los niños se estratificó en los grupos de 6-23 meses y 24-59 meses. El análisis de cada modificador de efecto incluyó un término de interacción entre el posible modificador de efecto y variable lactancia materna exclusiva dentro del modelo de regresión GLM y la medición de la interacción se realizó usando la escala multiplicativa. Finalmente, el análisis de datos se realizó con el paquete estadístico Stata, versión 16.1 (StataCorp, College Station, TX).

4.4.7 Cálculo de tamaño de muestra o potencia estadística

Se ha considerado una prevalencia del desenlace de aproximadamente 16% en el grupo no expuesto según el criterio clínico/bacteriológico de los

datos aun no publicados del estudio primario (“Detect”). Además, sabemos que en el Perú se tiene un reporte de lactancia exclusiva de 6 meses de 69.8% (76). Debido a que no tenemos un estudio similar al que proponemos, para hacer el cálculo de poder estadístico se tomó como referente aproximado el nivel de protección que pudiera otorgar la lactancia exclusiva materna en una enfermedad respiratoria frecuente en niños como la neumonía. Según un estudio, el Odds de adquirir neumonía en niños <2 años que no cumplen con una lactancia de 6 meses es 4.27 veces mayor comparado a un grupo que si cumple con la lactancia exclusiva de 6 meses (108). Se hipotetiza encontrar una reducción modesta de los casos de tuberculosis activa en el grupo expuesto a la lactancia exclusiva versus el grupo no expuesto debido a la exposición de los niños a un contacto con tuberculosis en el hogar el cual fue criterio de inclusión del estudio primario. Con estos datos considerando una regresión logística del desenlace binario en relación a una variable exposición binaria tendremos un poder ideal de 85% para detectar un cambio en la probabilidad del desenlace del valor basal de 16% a 4.5% que corresponde a un OR protector de 0.25 con un nivel de significancia de 0.05. El cálculo de tamaño de muestra fue realizado con el programa PASS versión 11 (NCSS, USA).

Además, realizamos más cálculos para otros escenarios posibles considerando también el efecto contrario de la hipótesis.

Resultados de cálculo de tamaño de muestra usando el PASS V.11

Logistic Regression Power Analysis

Numeric Results

Power	N	X=1	P0	P1	Ratio	Squared	Alpha	Beta
0.90896	279	70.000	0.160	0.037	0.200	0.000	0.05000	0.09104
*0.85453	279	70.000	0.160	0.045	0.250	0.000	0.05000	0.14547
0.78576	279	70.000	0.160	0.054	0.300	0.000	0.05000	0.21424
0.70548	279	70.000	0.160	0.063	0.350	0.000	0.05000	0.29452
0.61796	279	70.000	0.160	0.071	0.400	0.000	0.05000	0.38204

4.5 Resultados

Los resultados de esta segunda investigación fueron publicados previamente como primer autor en la revista *Global Health Action*, una revista ubicada en el primer cuartil (Q1) de impacto en las revistas indexadas (38).

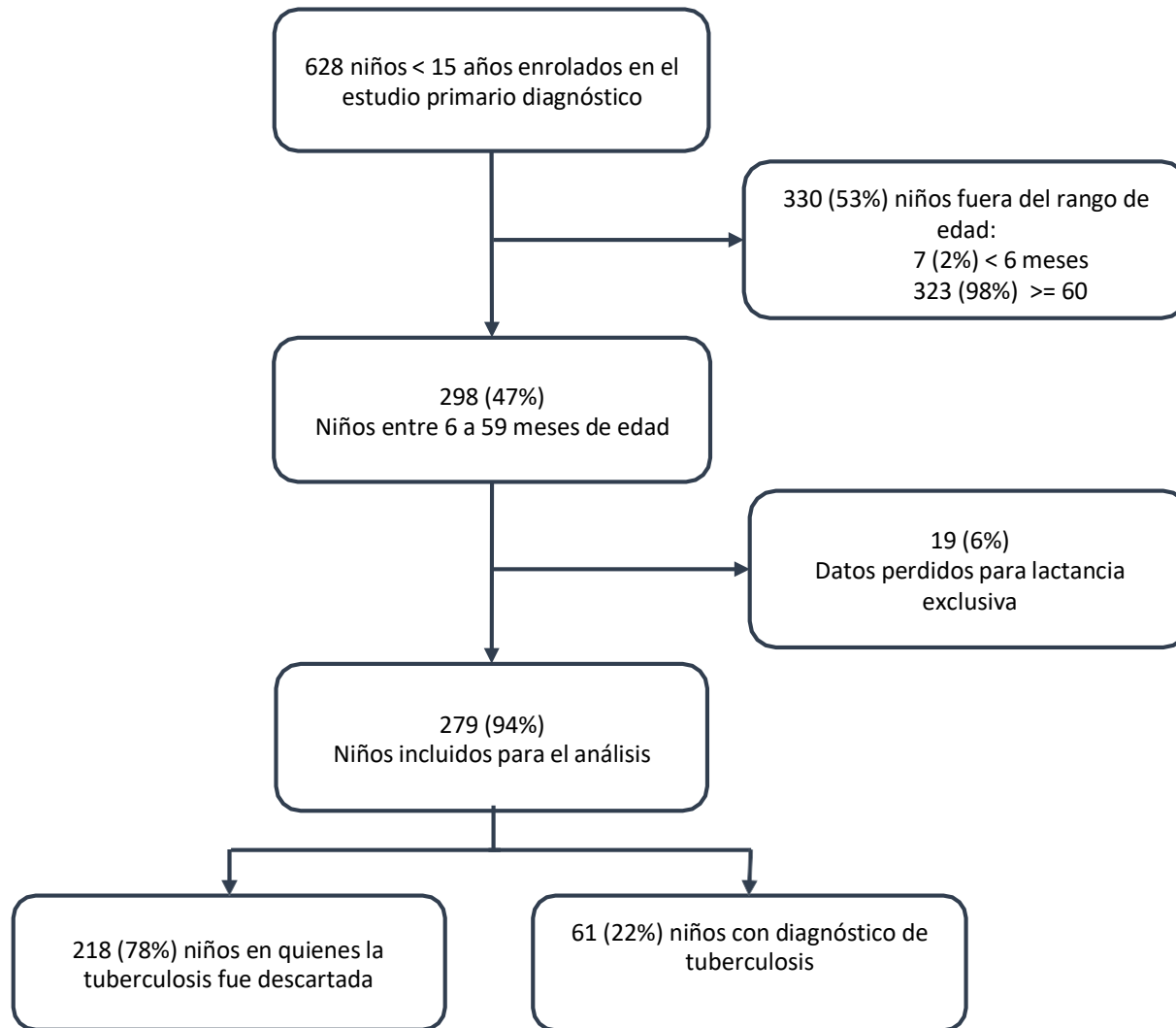
4.5.1 Enrolamiento y muestra de estudio

El estudio primario reclutó 628 niños menores de 15 años de edad. Para este análisis secundario de datos correspondiente a la segunda investigación de la tesis doctoral, se excluyó a 56% (349/628) de niños donde 330 estuvieron fuera del rango de edad de este análisis y 19 niños tuvieron datos ausentes para la variable exposición principal (ver figura 4). De este modo se incluyeron 279 niños comprendidos entre 6 a 59 meses de edad para este análisis, el 22% (61/279) de los niños fueron identificados con tuberculosis activa considerando alguno de los dos criterios de la definición de caso del análisis, de los cuales el 20% (12/61) fueron casos confirmados mediante cultivo. Con respecto a la lactancia materna exclusiva, el 72% (200/279) lo cumplió en los primeros 6 meses de vida, el 28% restante de niños tuvieron una mediana de lactancia exclusiva de 4 meses (IQR = 2-5 meses). Todos los niños incluidos fueron HIV negativos y solo el 6.2% (17/276) de ellos tuvo en algún momento quimioprofilaxis con Isoniazida.

El índice socioeconómico fue calculado en 278 de 279 participantes en base a características de la vivienda y posesiones mediante un análisis de componentes principales. Entre las principales características de las viviendas

tenemos que menos de la tercera parte de los participantes cuentan con una computadora, microondas, teléfono convencional o vehículo a motor y el 53% de los participantes posee más de una ventana hacia el exterior (Apéndice 2). El puntaje del análisis de componentes principales fue usado en forma continua como confusor a priori en la descripción de la variable índice socioeconómico. Otras variables importantes para el análisis final están descritas en la tabla 9.

Figura 4. Flujograma de los niños reclutados y analizados



4.5.2 Análisis bivariado

El análisis bivariado no mostró asociación entre lactancia exclusiva y la presencia de TB pulmonar activa (RP=1.46; IC 95% = 0.84-2.54). Se realizaron análisis bivariados en las demás variables para identificar confusores, sin embargo, ninguna variable fue menor al corte de $p \leq 0.2$ frente al desenlace y exposición.

Tabla 9. Características de niños expuestos a lactancia materna exclusiva (N=279)*

Variables	Total n (%)	Lactancia exclusiva por seis meses	
		Si (N=200) n (%)	No (N=79) n (%)
Edad (meses)			
< 24	112 (40)	80 (71)	32 (29)
24 to 59	167 (60)	120 (72)	47 (28)
Sexo			
Hombre	149 (53)	103 (69)	46 (31)
Mujer	130 (47)	97 (75)	33 (25)
Caso índice es la madre (N=275)			
Si	96 (35)	63 (66)	33 (34)
No	179 (65)	133 (74)	46 (26)
Caso índice comparte la cama con el niño (N=275)			

Si	118 (43)	80 (68)	38 (32)
No	157 (57)	116 (74)	41 (26)
Caso índice bebe alcohol (N=274)			
Si	171 (62)	126 (74)	45 (26)
No	103 (38)	70 (68)	33 (32)
Caso índice fuma (N=273)			
Si	110 (40)	84 (76)	26 (24)
No	163 (60)	111 (68)	52 (32)
ISE (N=278)			
Mediana (IQR)	-0.05 (2.8)	-0.05 (2.3)	-0.13 (2.4)
Niño usó Isoniacida como profilaxis			
Si	17 (6)	10 (59)	7 (41)
No	259 (94)	189 (73)	70 (27)
TB diagnosticada			
Si	61 (22)	48 (79)	13 (21)
No	218 (78)	152 (70)	66 (30)

* A menos que se indique lo contrario

Abreviación: IQR=Rango intercuartil, TB = tuberculosis, ISE = Índice socioeconómico

4.5.3 Análisis de regresión múltiple

En el análisis multivariado luego de ajustar por las variables sexo e índice socioeconómico, se encontró que los niños que tuvieron lactancia exclusiva por 6 meses tuvieron 56% más riesgo de tener TB pulmonar activa en comparación con los niños que no recibieron lactancia exclusiva. Sin embargo, este resultado fue no significativo (aRP=1.56; IC95% = 0.9–2.7, p=0.111). (Tabla 10). Alternativamente, luego de usar la variable lactancia exclusiva en su forma numérica expresada en meses y luego de ajustar por los mismos confusores, se encontró el mismo resultado de no asociación (aRP=1.00; IC95% = 1.00-1.00, p=0.983), lo que se traduce en que en los niños no hay una diferencia en el riesgo de adquirir tuberculosis por cada mes de lactancia exclusiva recibida, siendo un poco diferente a cuando se analizó esta variable en su forma dicotómica de cumplimiento o no de la lactancia exclusiva de 6 meses (p=0.983 vs p=0.111 respectivamente).

4.5.4 Otros análisis

En este análisis se exploró la posibilidad de contar con modificadores de efecto en las variables edad y madre siendo el caso índice. Para ello, en un primer análisis, se estratificó por grupos de edad y se encontró que en los niños de 6 a 23 meses de edad lactados exclusivamente por 6 meses, hubo mayor riesgo de presentar TB activa en comparación al estrato de edad de 24 a 59 meses de edad (aRP=2.20 vs aRP=1.25 respectivamente), sin embargo, no se pudo evidenciar la presencias de interacción dada por la variable edad (p=0.390)

(tabla 10). El segundo análisis exploratorio, luego de estratificar por la condición en que la madre fuera el caso índice de TB, se observó en el estrato cuyas madres fueron el caso índice que los lactados exclusivamente tuvieron aproximadamente el doble de riesgo de presentar TB activa comparado al estrato donde la madre no era el caso índice (aRP=2.07 vs aRP=1.19 respectivamente), sin embargo, nuevamente no se pudo evidenciar la presencia de interacción dada por la condición de caso índice de la madre ($p = 0.380$) (tabla 11).

Tabla 10. Asociación entre lactancia exclusiva por seis meses y tuberculosis en niños entre 6 a 59 meses estratificado por edad

	Sin lactancia materna exclusiva		Con lactancia materna exclusiva		aRPs (IC 95%) para lactancia exclusiva dentro del estrato de edad
	N con/sin TB	aRP (IC 95%)‡	N con/sin TB	aRP (IC 95%)‡	
Estratificado por edad					
24 a 59 meses	9/38	Referencia	26/94	1.25 (0.61-2.54); p=0.540	1.25 (0.61-2.54); p=0.540
6 a 23 meses	4/28	0.67 (0.20 - 2.29); p=0.526	22/58	1.39 (0.85-2.27); p=0.191	2.20 (0.84-5.75); p=0.109**

Medición de modificación del efecto en la escala multiplicativa: razón de RPs (IC 95%) = 1.69 (0.51-5.58); p = 0.390

‡ Los análisis se realizaron usando modelos de regresión binomial GLM que fueron ajustados por sexo e índice socioeconómico

aRP= razón de prevalencia ajustado; IC=Intervalo de confianza

**Estas variables tuvieron un dato perdido para un niño

Tabla 11. Asociación entre lactancia exclusiva por seis meses y tuberculosis en niños entre 6 a 59 meses estratificado por tipo de contacto

	Sin lactancia materna exclusiva		Con lactancia materna exclusiva		RPs (IC 95%) para lactancia exclusiva dentro del estrato tipo de contacto
	N con/sin TB	aRP (IC 95%)‡	N con/sin TB	aRP (IC 95%)‡	
Estratificado por contacto					
Caso índice no fue la madre	8/38	Referencia	27/106	1.19 (0.58-2.44); p=0.640	1.19 (0.58-2.44); p=0.640**
Caso índice fue la madre	5/33	0.83 (0.28-2.42); p=0.735	19/44	1.25 (0.76-2.08); p=0.374	2.07 (0.88-4.91); p=0.097

Medición de modificación del efecto en la escala multiplicativa: razón de RPs (IC 95%) = 1.66 (0.54-5.11); p = 0.380

‡ Los análisis se realizaron usando modelos de regresión binomial GLM que fueron ajustados por sexo e índice socioeconómico

aRP= razón de prevalencia ajustado; IC=Intervalo de confianza

**Estas variables tuvieron un dato perdido para un niño

4.6 Discusión

La lactancia exclusiva materna no se encontró asociada a la tuberculosis activa en niños menores de 5 años de edad. Asimismo, no se encontró evidencia suficiente luego de estratificar por los niños entre 6 y 23 meses o los niños cuyas madres fueron caso índice de TB de que los seis meses de lactancia materna exclusiva estuviera positivamente asociada a la tuberculosis.

A la fecha, no se encontraron estudios relacionados al presente análisis exploratorio, por lo que estos resultados no podemos compararlos con algún otro análisis y deben ser interpretados con cautela. Sin embargo, es importante considerar estos resultados como una primera exploración para resolver la pregunta de investigación planteada. Inicialmente, se planteó la hipótesis protectora de la lactancia exclusiva de 6 meses sobre la tuberculosis activa basado en tres evidencias; primero, la leche materna protege sobre infecciones bacterianas y virales en vías respiratorias aéreas y otras enfermedades (31-33); segundo, la leche materna desempeña un rol importante en la educación del sistema inmune al proveer señales que generan una apropiada respuesta y memoria inmunológica (94); Tercero, basado en estudios pre-clínicos en modelos animales o cultivos celulares se evidenció que los componentes de leche materna pueden actuar como un inhibidor de crecimiento bacteriano de *M. tuberculosis* (95-97).

Son incuestionables los beneficios de la lactancia materna como medio de alimentación saludable y barata. La OMS recomienda que la lactancia continúe independientemente del estatus de tuberculosis de la madre siempre

y cuando la madre con tuberculosis activa se encuentre recibiendo tratamiento anti tuberculosis de forma apropiada (109). Solo es recomendado dejar de brindar lactancia materna al bebé si una mujer evidencia tener lesiones activas tuberculares de pecho o mastitis tubercular (110). Es importante mencionar que en casos donde la madre tenga TB activa y se encuentre lactando a su bebé, se deben usar medidas protectoras generales tales como el uso de mascarillas durante la lactancia y dentro del hogar, particularmente en las fases iniciales de tratamiento (109, 110).

En la exploración de posibles modificadores de efecto, no se encontró interacción de la edad o cuando la madre fue el caso índice para la asociación de la lactancia materna exclusiva y la tuberculosis activa. Esto nos hace sospechar que la carga de exposición a tuberculosis en niños menores de 5 años expuestos a un caso de tuberculosis en el hogar, podría jugar un rol determinante que superaría el nivel de protección teórica que otorgaría la lactancia exclusiva de 6 meses, sobre todo en los más pequeños; o también que el periodo para el desarrollo de la protección es tan lento que resulta ser superada por la carga de la exposición. Estas nuevas hipótesis necesitan ser investigadas bajo un diseño longitudinal. De confirmarse esta hipótesis y encontrar una mayor predisposición en los lactados exclusivamente para desarrollar tuberculosis activa en las madres con tuberculosis o en los grupos de edad menores, se deben reforzar las medidas de protección que recomienda la OMS en madres con TB al momento de la lactancia que consideran el uso de protección respiratoria en la madre al momento de dar de lactar (111), continuar lactando al bebé exclusivamente, usar o mejorar las medidas de

ventilación en el hogar, así como realizar tamizaje a TB durante la gestación para una rápida identificación de casos de TB y otorgar un tratamiento oportuno en los casos índice identificados en el hogar incluida a la madre. Estas consideraciones pueden ser tomadas en cuenta mientras se diseñen nuevos estudios que confirmen estas nuevas hipótesis debido a que el grupo de niños menores de 5 años es más vulnerable en un ambiente con alta exposición a tuberculosis (78-80, 112) y donde además hay carencia de un diagnóstico efectivo y temprano (113).

La medición de la LME es compleja, debido a que los valores pueden variar según la definición usada de LME, el tipo del instrumento usado, el período de la medición e incluso la edad del niño (114). En muchos estudios la medición retrospectiva de la LME es usada por su facilidad (101). A pesar de ello, su validez y confiabilidad han sido cuestionadas debido a su dependencia del recuerdo del entrevistado (115). En estos estudios retrospectivos que usan algunos estudios, programas o sistemas de vigilancia para monitorear tendencias de alimentación infantil, las madres o cuidadoras responden cuestionarios vía e-mail, teléfono o entrevistas persona-persona que incluyen preguntas relacionadas a la iniciación de la lactancia mediante preguntas como ¿alguna vez el niño fue amamantado? o sobre la duración de la lactancia con preguntas como ¿durante cuánto tiempo el niño fue lactado? o también relacionadas a la duración de la lactancia materna exclusiva con preguntas sobre ¿a qué edad tuvo el niño la primera introducción de comidas o líquidos diferentes a la leche materna? (ver apéndice 3).

Hay pocos estudios que evalúan la validez de las mediciones retrospectivas de la lactancia materna exclusiva. En una revisión de 11 estudios entre 1966 y 2003 se evaluó la validez y reproducibilidad de la medición retrospectiva de LME, evidenciándose que la medición de la iniciación y duración de la lactancia hasta los 3 años de edad son válidas y reproducibles (102). Sin embargo, no es muy confiable la medición cuando se trata de medir la duración de la lactancia exclusiva e incluso hay diferencias significativas en el recuerdo de tipo de comida o líquido introducido dentro de los 6 meses iniciales de edad. El trabajo de tesis usó las preguntas de iniciación y duración de lactancia de la forma en que el estudio de revisión analizó (102), pero incluyó una población menor de 59 meses y no menor a 3 años; además, la pregunta formulada en la tesis para la duración de lactancia exclusiva difiere a la del estudio de revisión por incluir el término exclusivamente en su formulación lo que podría haber inducido a respuestas socialmente correctas entre las personas cuidadoras. Otros estudios de validación mostraron una buena sensibilidad y concordancia en mediciones retrospectivas dentro del primer año de edad del niño cuando fueron comparadas a la medición de referencia según OMS/UNICEF pero de hasta los 3 meses (105). Así también, cuando se evaluó la validez de la medición retrospectiva a los nueve meses de edad; se encontró una validez adecuada cuando el cuestionario incluyó preguntas relacionadas a la edad de la primera ingesta de una lista de alimentos o bebidas y fue menor cuando solo se preguntó la edad en que se discontinuó la LME (103). Finalmente, en un reciente estudio publicado en agosto de 2022 que usó información de encuestas colectadas entre 2010 y 2017 en más de 6700 infantes menores de 1

año de Bangladesh, Vietnam y Nigeria, donde usaron la medición de OMS/UNICEF como el estándar y la evaluaron con 4 métodos de medición retrospectiva: 1. LME en las 24 horas previas cuando los infante fueron evaluados a los 4-5.9 meses y 6-7.9 meses (EBF-24H-Pul); 2. Infantes que no recibieron otro alimento más que la leche materna en los primeros 6 meses de nacidos (EBF-SB); 3. La misma definición en EBF-SB pero cuando los infantes fueron evaluados a los 4-5.9 meses y 6-7.9 meses (EBF-SB-Pul) y 4. Infantes entre 6-11.9 meses que no recibieron otro alimento más que la leche materna en los primeros 6 meses de nacidos (EBF-AI); el estudio remarcó la validez de la medición EBF-AI sobre los otros 3 métodos de medición (104). Nuevamente, esta validez es mejor cuando se formulan preguntas sobre la edad en la que hubo introducción de algún líquido o comida.

En este estudio se tuvieron algunas limitaciones a considerar. La principal de ellas fue relacionada a la medición retrospectiva de la variable exposición principal considerando niños menores de 59 meses de edad. La UNICEF y la Organización mundial de la Salud (OMS) en 1991 (116) y en su última actualización de 2021 (117) recomiendan realizar las mediciones de lactancia materna exclusiva en función a si los niños menores de 6 meses de edad son lactados sin otro alimento más que la leche materna en el día anterior a la encuesta (118). En la tesis, no se midió la LME de acuerdo a esta recomendación y la forma retrospectiva empleada tuvo un rango de edad mayor a un año de edad del infante y podría de esta forma no ser válida su medición, por ende, los resultados deben ser interpretados con cautela. Por otro lado, en la revisión de estudios relacionados a LME, se evidencia que no

solo se miden de acuerdo a las recomendaciones dadas por OMS, sino también hay mediciones retrospectivas que han sido usadas en diferentes estudios en los últimos años (ver apéndice 3). Un método prospectivo sería la forma ideal de medir la lactancia exclusiva, sin embargo ello implica el uso de mayores recursos que escasos estudios podrían solventar (102). Tanto el método de medición del recuerdo de las últimas 24 horas o el método retrospectivo luego de los 6 meses de edad tienen sus propias limitaciones. El método recomendado por OMS por ejemplo, está limitado al cumplimiento de la lactancia exclusiva en las 24 horas previo a la encuesta, siendo imposible medir la exclusividad de la lactancia luego del día de la entrevista. Se ha descrito que éste método de medición sería más confiable cuando los niños están entre los 5 a <6 meses que cuando son más pequeños (119) y también ha sido discutido por diversos investigadores sobre su aplicabilidad ya que podría incrementar la proporción real de lactados de forma exclusiva por asumirse que representan a todo el período de seis meses (120-122). Por otro lado, la medición retrospectiva tiene el inconveniente de crear un sesgo de recuerdo que es mayor a medida que la edad avanza y que podría permitir una mala clasificación de la exposición resultando así en mediciones sesgadas de la asociación como ha sido mostrado anteriormente (102, 123-126). Debido a que la evaluación retrospectiva de la duración de la lactancia materna exclusiva puede ser sobreestimada sistemáticamente (103), incrementando la proporción de los lactantes exclusivos cuando realmente no lo son tanto para el grupo con y sin el desenlace; ello implicaría caer en una mala clasificación no diferencial (127), que podría diluir el efecto de la posible relación entre la

lactancia materna exclusiva y la tuberculosis que se hipotetizó en el estudio. Por tanto, nuestros resultados de la relación entre la lactancia exclusiva y la tuberculosis podrían estar subestimados.

Otra limitación podría ser el uso combinado de criterios (microbiológico y clínico) para la evaluación del desenlace que podría tener una clasificación errónea en determinar correctamente los casos. Ciertamente, creemos que actualmente es una aproximación adecuada para determinar un caso de tuberculosis considerando que el cultivo microbiológico por si solo posee una baja sensibilidad y que en la práctica médica en nuestro medio, el diagnóstico clínico es habitualmente usado y que además el estudio planteado es un análisis no confirmatorio de la hipótesis planteada. El criterio mixto que se está incluyendo para la medición del desenlace ha sido también usado en estudios de tuberculosis en niños lo cual apoya su uso mientras no se tenga una prueba con mejor precisión diagnóstica (40, 128, 129), aun así debe interpretarse con cautela alguna asociación cuando se usa este criterio.

El estudio incluyó un diseño transversal y además solo participaron niños con resultados negativos a VIH donde se ha demostrado que en esta población pueden ocurrir resultados falsos positivos en las pruebas de PCR para TB, aunque en menor proporción que en los VIH positivos (69); todo ello impide la generalizabilidad de los resultados. Otra limitación fue la carencia de información sobre el tiempo de desarrollo de la enfermedad del caso índice en el hogar mientras el niño era lactado en sus primeros 6 meses de edad, lo que limita una mejor medición de la exposición a tuberculosis en el infante y

conocer el rol de la lactancia exclusiva en este período. Esto último podría ser resuelto diseñando un estudio longitudinal.

Si bien los resultados del estudio mostraron una asociación positiva, pero no significancia entre la asociación de la lactancia exclusiva y la tuberculosis pulmonar en los niños, no es posible llegar a alguna conclusión firme sobre la real asociación debido al desconocimiento de la validez de la medición retrospectiva de la lactancia materna exclusiva e incluso debido a la medición de la tuberculosis en el estudio. Además, los resultados de una posible asociación positiva contradecirían la hipótesis sustentada de ser la lactancia exclusiva un factor protector, sugiriendo ser así un factor de riesgo para tuberculosis, cuando habrían otros factores que podrían explicar un incremento del riesgo a tuberculosis en el hogar que no solo están relacionadas a la cercanía por dar de lactar sino también los relacionados al cuidado infantil por haber sido expuestos con adultos con TB en los dos últimos años según el diseño del estudio e incluso factores relacionados a condiciones de inseguridad económica (80, 130).

Los beneficios de la lactancia materna exclusiva son indiscutibles (31-33, 72, 108, 131) y lo mostrado en este primer análisis muestran la necesidad de contar con mayores estudios que puedan tomar en cuenta las limitaciones mostradas para llegar a un mejor resultado de la hipótesis planteada cuyos resultados serían fundamentales para el reforzamiento de las medidas de control de la tuberculosis en niños.

VI. ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo del estudio primario denominado “Estrategias para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis en niños (DETECT-Niños)” fue aprobado originalmente por la junta de revisión institucional de la escuela de medicina de la Universidad de Harvard y también por el comité de ética del Instituto Nacional de Salud del Perú. En el estudio DETECT-Niños se usó tanto consentimiento informado por los padres como el asentimiento informado de los niños. Además para la presentación de la tesis doctoral, el protocolo que incluyeron dos investigaciones relacionadas fue aprobado por el comité institucional de ética en investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el código de inscripción N° 102888.

Para el presente estudio de tesis, los riesgos son mínimos para los participantes, debido a que se recopilaban datos ya existentes de los registros del estudio primario que están almacenados en las bases de datos y que para acceder se tuvo el permiso de la investigadora principal quien hizo entrega de solo las variables solicitadas evitando transferir los identificadores personales. Por este motivo en este estudio no se solicitará consentimiento/asentimiento informado pues las muestras ya han sido colectadas al igual que los datos bajo un consentimiento/asentimiento informado original del estudio primario.

Durante la implementación del estudio se respetaron los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y se siguieron estrictamente las recomendaciones realizadas por el CIE-UPCH.

Cabe resaltar que en la presenta tesis se realizaron dos investigaciones:

1) Una primera investigación de tipo diagnóstica, que fue un análisis secundario de datos, por lo que no se tuvo contacto alguno con sujetos humanos. En tal sentido, los posibles riesgos para los sujetos del análisis fueron mínimos y se respetó la confidencialidad de los datos.

2) Una segunda investigación, que fue un estudio anidado en el estudio primario que contaba con financiamiento ya existente; en este estudio se tuvo algún contacto con los sujetos humanos en la colección de los datos, especialmente en algunas muestras biológicas producto del trabajo de campo. Sin embargo, los riesgos de los participantes fueron mínimos y se guardó la confidencialidad de los datos.

VII. LIMITACIONES

Estudio 1. Evaluación del desempeño diagnóstico de dos muestras biológicas orales para el diagnóstico de tuberculosis en menores de 15 años

La principal limitación fue la falta de seguimiento a los controles considerados en el estudio como sanos; sobretodo, considerando que se obtuvo resultados falsos positivos bajo la definición de caso usado lo cual podría haber subestimado la sensibilidad encontrada pero al tener solo 2 falsos positivos, el sesgo no sería muy significativo. Una segunda limitación fue usar cantidades diferentes de muestra inicial para la extracción de ADN tanto en los dispositivos de colección Omniswab y EasiCollect. Estas diferencias se dieron por la limitada cantidad de muestras disponibles para la fase de optimización de los ensayos moleculares. A pesar de no encontrar diferencias significativas usando ambos dispositivos de colección, se recomienda usar una cantidad constante de muestra de donde se extraerá el ADN para los ensayos moleculares.

Debido a que los controles estuvieron emparejados con los casos hasta en una proporción 2 a 1, no se pudo evaluar los valores predictivos positivo o negativo debido a que el grupo control incluido en el análisis no representó al verdadero grupo control en quienes la TB fue descartada.

Estudio 2. Asociación entre los 6 meses de lactancia materna exclusiva y la tuberculosis activa en niños entre 6 meses y menores a de 5 años de edad

La principal limitación encontrada fue el sesgo de memoria por las madres en la medición de la variable lactancia exclusiva. Relacionado a ello, la pregunta formulada en el estudio para definir la variable lactancia materna exclusiva no fue validada en el estudio. De acuerdo a la OMS y UNICEF, la medición en el estudio, no concuerdan con sus recomendaciones de medición donde se debe medir entre infantes de 0-5 meses consultando si ha recibido leche materna en las últimas 24 horas (118). Por otro lado, en estudios retrospectivos es formulada considerando el consumo de alguna comida adicional a la leche materna o la introducción de leche de fórmula, mientras que en la tesis fue referida como la duración de la lactancia materna exclusiva. Ésta forma de medir la lactancia exclusiva podría subestimar la proporción de lactados exclusivamente lo cual podría invalidar el resultado obtenido. Por tanto, los resultados mostrados en este estudio exploratorio deben ser interpretados con cautela. El diseño transversal del estudio impidió la generalización de los resultados. Otra limitación fue la carencia de información sobre el tiempo de desarrollo de la enfermedad del caso índice, sea la madre o alguien en el hogar mientras el niño era lactado en sus primeros 6 meses de edad, para distinguir si presentaba o no tuberculosis al momento de dar de lactar al niño o incluso del tiempo de desarrollo de la tuberculosis en el niño, lo que limitaría conocer el rol de la lactancia exclusiva en su posible rol protector, así también carencia de otros confusores como el nivel de instrucción del cuidador principal. Estas

limitaciones podrían ser reducidas diseñando estudios longitudinales o mediciones repetitivas en momentos específicos cortos. Para la exploración de modificadores de efecto, la principal limitación fue tener poco poder para un sub-análisis, por lo que este análisis fue considerado exploratorio. A pesar de las limitaciones, al tratarse de un primer estudio exploratorio para resolver la hipótesis planteada de que la lactancia exclusiva sea un factor protector contra la tuberculosis, el estudio sirve de punto inicio a investigaciones más robustas usando mejores diseños donde la medición prospectiva o retrospectiva sean los recomendados.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales evidencian que es posible detectar ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras bucales de niños menores de 15 años. Este es un hallazgo muy importante en la búsqueda de fuentes no invasivas de muestra biológica para la detección de tuberculosis pediátrica. Asimismo, se encontró una sensibilidad de la prueba de PCR en tiempo real de 20% (IC 95%: 7%-41%) y especificidad de 99% (IC95%: 96%-100%) usando los hisopados bucales de niños con tuberculosis pulmonar confirmada. En cuanto a la diferencia entre los dispositivos de colección usados, se encontró que el Omniswab tuvo una sensibilidad de 33.3% (IC 95%: 10%-65%) el cual fue mayor a la sensibilidad de 7.7% (IC 95%: 0%-36%) del Easicollect, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Los factores asociados a la positividad fueron tener previamente un resultado positivo de coloración Ziehl Neelsen de esputo así como la presencia de cavidades en la radiografía de tórax y la habilidad para expectorar el esputo de forma espontánea.

Con respecto al posible rol protector de la leche materna en la tuberculosis pulmonar activa en niños entre 6 a 59 meses, no se logró encontrar evidencia de un efecto protector de la lactancia materna exclusiva por seis meses. Además en la exploración de posibles modificadores de efecto, luego de estratificar por los niños entre 6 y 23 meses y entre quienes el contacto índice fue la madre, tampoco hubo evidencia de que ambas sean posibles modificadores de efecto. Los resultados de este primer análisis exploratorio deben ser interpretados con cautela debido a las limitaciones en la medición de las variables discutidas previamente. Con ambos estudios mostrados, es

evidente continuar en los esfuerzos de encontrar un diagnóstico oportuno y manejo anti tuberculoso en los niños, las mujeres embarazadas y en las que actualmente se encuentran amamantando a sus bebés y que las mediciones de variables importantes para evaluar factores protectores contra tuberculosis en niños deben ser mejorados para reducir los sesgos.

IX. RECOMENDACIONES GENERALES

Actualmente es conocida la limitación de un preciso y oportuno diagnóstico de la tuberculosis en niños; principalmente por las pruebas que poseen una baja sensibilidad. Con los resultados de los dos estudios mostrados se recomienda evaluar otros métodos de colección alternas que resultaron con algún éxito en adultos al usar los Flocked swabs (Puritan, USA)(58). Además, se recomienda continuar con la exploración de la mucosa oral, donde algunos reportes han encontrado resultados prometedores al usar un hisopado de lengua (58). No se descarta hacer uso de otras fuentes prometedoras de muestra biológica en niños como las heces, donde también el grupo de investigación con el que se trabajó en la tesis ha venido trabajando de forma paralela. Estas nuevas fuentes de muestra son interesantes y prometedoras de trabajar en futuros estudios, así como el uso del GeneXpert (Cepheid, USA) como metodología para clasificar un caso. Teniendo una herramienta con mejor sensibilidad diagnóstica de tuberculosis pediátrica podremos clasificar de una mejor manera los casos de tuberculosis para poder hacer estudios más precisos de factores protectores como el de la lactancia materna exclusiva que se realizó en este estudio. Sobre el segundo estudio, los siguientes estudios que prueben la hipótesis planteada en la tesis, además del uso de mejores métodos de diagnóstico, deben utilizar métodos de medición de lactancia exclusiva validados y recomendados. Sobre la medición de lactancia exclusiva, actualmente el método recomendado la evalúa antes de los 6 meses de edad. Una opción ideal es usar métodos prospectivos para determinar la lactancia exclusiva y la presencia de tuberculosis en el momento en que se

desarrolla en el niño para una mejor medición del rol protector de la lactancia exclusiva. Finalmente, es muy importante considerar el estado de infección de tuberculosis de la madre realizando un seguimiento para determinar el tiempo de inicio de infección de la madre ya que esta variable no se pudo evaluar en este análisis y podría tener un rol importante en la demostración de la hipótesis planteada.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dodd PJ, Yuen CM, Sismanidis C, Seddon JA, Jenkins HE. The global burden of tuberculosis mortality in children: a mathematical modelling study. *Lancet Glob Health*. 2017;5(9):e898-e906.
2. Hasegawa K, Tsugawa Y, Cohen A, Camargo CA, Jr. Infectious Disease-related Emergency Department Visits Among Children in the US. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(7):681-5.
3. Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet*. 2013;381(9875):1405-16.
4. WHO. Global tuberculosis report 2021 Geneva: World Health Organization: World Health Organization; 2021 [Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>].
5. WHO. Global tuberculosis report 2020 Geneva: World Health Organization: World Health Organization; 2020 [Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>].
6. Cek M, Lenk S, Naber KG, Bishop MC, Johansen TE, Botto H, et al. EAU guidelines for the management of genitourinary tuberculosis. *Eur Urol*. 2005;48(3):353-62.
7. Moussa OM, Eraky I, El-Far MA, Osman HG, Ghoneim MA. Rapid diagnosis of genitourinary tuberculosis by polymerase chain reaction and non-radioactive DNA hybridization. *J Urol*. 2000;164(2):584-8.
8. Starke JR. Tuberculosis in children. *Curr Opin Pediatr*. 1995;7(3):268-77.
9. Burdz TV, Wolfe J, Kabani A. Evaluation of sputum decontamination methods for Mycobacterium tuberculosis using viable colony counts and flow cytometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47(3):503-9.
10. Chiang SS, Swanson DS, Starke JR. New Diagnostics for Childhood Tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29(3):477-502.
11. Marais BJ, Hesselning AC, Gie RP, Schaaf HS, Enarson DA, Beyers N. The bacteriologic yield in children with intrathoracic tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2006;42(8):e69-71.
12. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, Swingler G, Hussey G. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet*. 2005;365(9454):130-4.
13. Ashok Garg RS, Jyotsna Sharma, Pancham Kumar, Sandhya Chauhan, Deepak Sharma. Clinical Profile of Pediatric Tuberculosis and MGIT sensitivity: A Prospective Study from a Tertiary care Institute. *Journal of Medical Science and Clinical Research*. 2017;05(05):21447-53.
14. Tiwari S, Nataraj G, Kanade S, Mehta P. Diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis with special reference to polymerase chain reaction based nucleic acid amplification test. *Int J Mycobacteriol*. 2015;4(1):48-53.
15. el-Sayed Zaki M, Abou-el Hassan S. Clinical evaluation of Gen-Probe's amplified mycobacterium tuberculosis direct test for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in Egyptian children at risk for infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(2):244-7.

16. Mesman AW, Soto M, Coit J, Calderon R, Aliaga J, Pollock NR, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pediatric stool samples using TruTip technology. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):563.
17. 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(1):16-23.
18. Papaventsis D, Ioannidis P, Karabela S, Nikolaou S, Syridou G, Marinou I, et al. Impact of the Gen-Probe Amplified MTD(R) Test on tuberculosis diagnosis in children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(3):384-90.
19. WHO. High priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting, 28-29 April 2014, Geneva, Switzerland Geneva: World Health Organization: World Health Organization; 2014 [Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/135617>].
20. Wood RC, Luabeya AK, Weigel KM, Wilbur AK, Jones-Engel L, Hatherill M, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA on the oral mucosa of tuberculosis patients. *Sci Rep.* 2015;5:8668.
21. Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* 2013;81(7):2645-59.
22. Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Hidaka E, Katsuyama T, Stang B, et al. The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2006;8(5):806-14.
23. Freeman R, Geier H, Weigel KM, Do J, Ford TE, Cangelosi GA. Roles for cell wall glycopeptidolipid in surface adherence and planktonic dispersal of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(12):7554-8.
24. Geier H, Mostowy S, Cangelosi GA, Behr MA, Ford TE. Autoinducer-2 triggers the oxidative stress response in *Mycobacterium avium*, leading to biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(6):1798-804.
25. Engel GA, Wilbur AK, Westmark A, Horn D, Johnson J, Jones-Engel L. Naturally acquired *Mycobacterium tuberculosis* complex in laboratory pig-tailed macaques. *Emerg Microbes Infect.* 2012;1(10):e30.
26. Wilbur AK, Engel GA, Rompis A, IG AP, Lee BP, Aggimarangsee N, et al. From the mouths of monkeys: detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from buccal swabs of synanthropic macaques. *Am J Primatol.* 2012;74(7):676-86.
27. Wilbur AK, Kubatko LS, Hurtado AM, Hill KR, Stone AC. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility *M. tuberculosis* in native Paraguayans. *Tuberculosis (Edinb).* 2007;87(4):329-37.
28. Nakaoka H, Lawson L, Squire SB, Coulter B, Ravn P, Brock I, et al. Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(9):1383-8.
29. Attah CJ, Oguche S, Egah D, Ishaya TN, Banwat M, Adgidzi AG. Risk factors associated with paediatric tuberculosis in an endemic setting. *Alexandria Journal of Medicine.* 2018;54(4):403-9.
30. Aibana O, Huang CC, Aboud S, Arnedo-Pena A, Becerra MC, Bellido-Blasco JB, et al. Vitamin D status and risk of incident tuberculosis disease: A

- nested case-control study, systematic review, and individual-participant data meta-analysis. *PLoS Med.* 2019;16(9):e1002907.
31. Duijts L, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics.* 2010;126(1):e18-25.
 32. Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ.* 1990;300(6716):11-6.
 33. Popkin BM, Adair L, Akin JS, Black R, Briscoe J, Flieger W. Breast-feeding and diarrheal morbidity. *Pediatrics.* 1990;86(6):874-82.
 34. Zheng JS, Liu H, Li J, Chen Y, Wei C, Shen G, et al. Exclusive breastfeeding is inversely associated with risk of childhood overweight in a large Chinese cohort. *J Nutr.* 2014;144(9):1454-9.
 35. Hasan Z, Arif F, Shakoor S, Mehnaz A, Akber A, Kanji A, et al. Effective testing for pulmonary tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay for stool specimens in immunocompetent Pakistani children. *International journal of mycobacteriology.* 2016;5:S8-S9.
 36. Nutrition ECo, Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, et al. Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(1):112-25.
 37. Flores JA, Calderon R, Mesman AW, Soto M, Coit J, Aliaga J, et al. Detection of Mycobacterium Tuberculosis DNA in Buccal Swab Samples from Children in Lima, Peru. *Pediatr Infect Dis J.* 2020;39(11):e376-e80.
 38. Flores JA, Coit J, Mendoza M, Leon SR, Konda K, Lecca L, et al. Is exclusive breastfeeding for six-months protective against pediatric tuberculosis? *Glob Health Action.* 2021;14(1):1861922.
 39. Aliaga JS, M.; Flores, A.; Coit, J.; Franke, M.; Holmberg, R.; Calderon R. Does effective heat inactivation of sputum specimens compromise detection of Mycobacterium tuberculosis via real-time PCR? The Netherlands: The Union; 2018 [cited 2019 october]. Available from: https://www.abstractserver.com/TheUnion2018/TheUnion2018_Abstracts_Web.pdf.
 40. Nicol MP, Wood RC, Workman L, Prins M, Whitman C, Ghebrekristos Y, et al. Microbiological diagnosis of pulmonary tuberculosis in children by oral swab polymerase chain reaction. *Sci Rep.* 2019;9(1):10789.
 41. Bates M, O'Grady J, Maeurer M, Tembo J, Chilukutu L, Chabala C, 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(1):36-42.
 42. Gous N, Scott LE, Khan S, Reubenson G, Coovadia A, Stevens W. Diagnosing childhood pulmonary tuberculosis using a single sputum specimen on Xpert MTB/RIF at point of care. *S Afr Med J.* 2015;105(12):1044-8.
 43. LaCourse SM, Chester FM, Preidis G, McCrary LM, Arscott-Mills T, Maliwichi M, et al. Use of Xpert for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in severely malnourished hospitalized Malawian children. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(11):1200-2.
 44. Nicol MP, Spiers K, Workman L, Isaacs W, Munro J, Black F, et al. Xpert MTB/RIF testing of stool samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *Clin Infect Dis.* 2013;57(3):e18-21.

45. Nicol MP, Workman L, Prins M, Bateman L, Ghebrekristos Y, Mbhele S, et al. Accuracy of Xpert Mtb/Rif Ultra for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37(10):e261-e3.
46. Yin QQ, Jiao WW, Han R, Jiao AX, Sun L, Tian JL, et al. Rapid diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis by Xpert MTB/RIF assay using bronchoalveolar lavage fluid. *Biomed Res Int*. 2014;2014:310194.
47. Rachow A, Clowes P, Saathoff E, Mtafya B, Michael E, Ntinginya EN, et al. Increased and expedited case detection by Xpert MTB/RIF assay in childhood tuberculosis: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2012;54(10):1388-96.
48. Sekadde MP, Wobudeya E, Joloba ML, Ssenooba W, Kitembo H, Bakeera-Kitaka S, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis in Uganda: a cross-sectional diagnostic study. *BMC Infect Dis*. 2013;13:133.
49. Wang X, Wu Y, Zhang K, Guan C, Gao X, Wang M. Value of real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(6):718-9.
50. Zar HJ, Workman L, Isaacs W, Munro J, Black F, Eley B, et al. Rapid molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis in children using nasopharyngeal specimens. *Clin Infect Dis*. 2012;55(8):1088-95.
51. Zar HJ, Workman L, Isaacs W, Dheda K, Zemanay W, Nicol MP. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in African children in a primary care setting by use of Xpert MTB/RIF on respiratory specimens: a prospective study. *Lancet Glob Health*. 2013;1(2):e97-e104.
52. Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, Wright VJ, Banwell CM, Chagaluka G, et al. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1712-23.
53. Portevin D, Moukambi F, Clowes P, Bauer A, Chachage M, Ntinginya NE, et al. Assessment of the novel T-cell activation marker-tuberculosis assay for diagnosis of active tuberculosis in children: a prospective proof-of-concept study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(10):931-8.
54. Nicol MP, Allen V, Workman L, Isaacs W, Munro J, Pienaar S, et al. Urine lipoarabinomannan testing for diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: a prospective study. *Lancet Glob Health*. 2014;2(5):e278-84.
55. Kroidl I, Clowes P, Reither K, Mtafya B, Rojas-Ponce G, Ntinginya EN, et al. Performance of urine lipoarabinomannan assays for paediatric tuberculosis in Tanzania. *Eur Respir J*. 2015;46(3):761-70.
56. Imaz MS, Comini MA, Zerbini E, Sequeira MD, Spoletti MJ, Etchart AA, 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(11):1036-43.
57. Chegou NN, Detjen AK, Thiart L, Walters E, Mandalakas AM, Hesselting AC, et al. Utility of host markers detected in Quantiferon supernatants for the diagnosis of tuberculosis in children in a high-burden setting. *PLoS One*. 2013;8(5):e64226.
58. Luabeya AK, Wood RC, Shenje J, Filander E, Ontong C, Mabwe S, et al. Noninvasive Detection of Tuberculosis by Oral Swab Analysis. *J Clin Microbiol*. 2019;57(3).

59. UN. Objetivos de desarrollo sostenible USA: United Nations; 2022 [Available from: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/health/>].
60. 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. *J Infect Dis.* 2012;205 Suppl 2:S199-208.
61. Jenum S, Dhanasekaran S, Lodha R, Mukherjee A, Kumar Saini D, Singh S, et al. Approaching a diagnostic point-of-care test for pediatric tuberculosis through evaluation of immune biomarkers across the clinical disease spectrum. *Sci Rep.* 2016;6:18520.
62. Raqib R, Mondal D, Karim MA, Chowdhury F, Ahmed S, Luby S, et al. Detection of antibodies secreted from circulating Mycobacterium tuberculosis-specific plasma cells in the diagnosis of pediatric tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(4):521-7.
63. Wang JX, Xu J, Han YF, Zhu YB, Zhang WJ. Diagnostic values of microRNA-31 in peripheral blood mononuclear cells for pediatric pulmonary tuberculosis in Chinese patients. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):17235-43.
64. Cole TJ. Too many digits: the presentation of numerical data. *Arch Dis Child.* 2015;100(7):608-9.
65. Lu PL, Yang YC, Huang SC, Jenh YS, Lin YC, Huang HH, et al. Evaluation of the Bactec MGIT 960 system in combination with the MGIT TBc identification test for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2290-2.
66. Mesman AW, Calderon R, Soto M, Coit J, Aliaga J, Mendoza M, et al. Mycobacterium tuberculosis detection from oral swabs with Xpert MTB/RIF ULTRA: a pilot study. *BMC research notes.* 2019;12(1):349.
67. Zar HJ, Workman LJ, Prins M, Bateman LJ, Mbhele SP, Whitman CB, et al. Tuberculosis Diagnosis in Children Using Xpert Ultra on Different Respiratory Specimens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019.
68. Wolf H, Mendez M, Gilman RH, Sheen P, Soto G, Velarde AK, et al. Diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis by stool PCR. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2008;79(6):893-8.
69. Oberhelman RA, Soto-Castellares G, Gilman RH, Castillo ME, Kolevic L, Delpino T, et al. A Controlled Study of Tuberculosis Diagnosis in HIV-Infected and Uninfected Children in Peru. *PLoS One.* 2015;10(4):e0120915.
70. Gupta-Wright A, Fielding KL, van Oosterhout JJ, Wilson DK, Corbett EL, Flach C, et al. Rapid urine-based screening for tuberculosis to reduce AIDS-related mortality in hospitalized patients in Africa (the STAMP trial): study protocol for a randomised controlled trial. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):501.
71. Paris L, Magni R, Zaidi F, Araujo R, Saini N, Harpole M, et al. Urine lipoarabinomannan glycan in HIV-negative patients with pulmonary tuberculosis correlates with disease severity. *Sci Transl Med.* 2017;9(420).
72. Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc.* 2007;66(3):384-96.
73. WHO. Breastfeeding Geneva: World Health Organization; 2015 [Available from: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/breastfeeding>].

74. WHO. Lactancia Materna Geneva: World Health Organization; [Available from: https://www.who.int/es/health-topics/breastfeeding#tab=tab_1.
75. WHO. World Health Statistics Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016 [Available from: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/.
76. INEI. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar Lima2016 [Available from: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1433/index.html.
77. INEI. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar Lima2017 [cited 2022 november]. Available from: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1525/index.html.
78. Lincoln EM. Course and prognosis of tuberculosis in children. *Am J Med.* 1950;9(5):623-32.
79. Rabes T, Baquero-Artigao F, Méndez-Echevarría AM, Mellado Peña MJ. Tuberculosis en lactantes menores de 3 meses. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2017;35(4):243-45.
80. Gomes VF, Andersen A, Wejse C, Oliveira I, Vieira FJ, Joaquim LC, et al. Impact of tuberculosis exposure at home on mortality in children under 5 years of age in Guinea-Bissau. *Thorax.* 2011;66(2):163-7.
81. Kaiser AM. Warm chain for breastfeeding. *Lancet.* 1994;344(8938):1701.
82. Chiba Y, Minagawa T, Mito K, Nakane A, Suga K, Honjo T, et al. Effect of breast feeding on responses of systemic interferon and virus-specific lymphocyte transformation in infants with respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol.* 1987;21(1):7-14.
83. Kowalski W. Pediatric Nosocomial Infections. In: Press C, editor. *Hospital Airborne Infection Control.* USA: CRC Press; 2016. p. 370.
84. Orlando S. The immunologic significance of breast milk. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 1995;24(7):678-83.
85. Levine OS, Farley M, Harrison LH, Lefkowitz L, McGeer A, Schwartz B. Risk factors for invasive pneumococcal disease in children: a population-based case-control study in North America. *Pediatrics.* 1999;103(3):E28.
86. Da Silva MV, Tiburcio MG, Machado JR, Silva DA, Rodrigues DB, Rodrigues V, et al. Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis. *J Immunol Res.* 2015;2015:639107.
87. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Immunol Rev.* 2015;264(1):74-87.
88. Li Q, Zhang H, Yu L, Wu C, Luo X, Sun H, et al. Down-regulation of Notch signaling pathway reverses the Th1/Th2 imbalance in tuberculosis patients. *Int Immunopharmacol.* 2018;54:24-32.
89. Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, Fielding K, Sillah J, Sow OY, et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol.* 2002;32(6):1605-13.
90. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and

- gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun.* 2007;75(2):820-9.
91. Vigano A, Esposito S, Arienti D, Zagliani A, Massironi E, Principi N, et al. Differential development of type 1 and type 2 cytokines and beta-chemokines in the ontogeny of healthy newborns. *Biol Neonate.* 1999;75(1):1-8.
 92. Krampera M, Vinante F, Tavecchia L, Morosato L, Chilosi M, Romagnani S, et al. Progressive polarization towards a T helper/cytotoxic type-1 cytokine pattern during age-dependent maturation of the immune response inversely correlates with CD30 cell expression and serum concentration. *Clin Exp Immunol.* 1999;117(2):291-7.
 93. Kelly D, Coutts AG. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc.* 2000;59(2):177-85.
 94. Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, Schmitt J, Boehm G, Dehlink E, et al. Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(8):1179-88.
 95. Alvarez N, Otero O, Camacho F, Borrero R, Tirado Y, Puig A, et al. Passive administration of purified secretory IgA from human colostrum induces protection against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model of progressive pulmonary infection. *BMC Immunol.* 2013;14 Suppl 1:S3.
 96. Alvarez N, Infante JF, Borrero R, Mata D, Payan JB, Hossain MM, et al. Histopathological Study of the Lungs of Mice Receiving Human Secretory IgA and Challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Malays J Med Sci.* 2014;21(3):31-7.
 97. Meikle V, Mossberg AK, Mitra A, Hakansson AP, Niederweis M. A Protein Complex from Human Milk Enhances the Activity of Antibiotics and Drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(2).
 98. Perez-Porcuna TM, Ascaso C, Ogusku MM, Abellana R, Malheiro A, Quinco P, et al. Evaluation of new strategies for the diagnosis of tuberculosis among pediatric contacts of tuberculosis patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(9):e141-6.
 99. SES-Perú. *Socios En Salud - Sucursal Perú* [Available from: <https://sociosensalud.org.pe>].
 100. Stegen G, Jones K, Kaplan P. Criteria for guidance in the diagnosis of tuberculosis. *Pediatrics.* 1969;43(2):260-3.
 101. Grummer-Strawn LM, Li R. US national surveillance of breastfeeding behavior. *J Hum Lact.* 2000;16(4):283-90.
 102. Li R, Scanlon KS, Serdula MK. The validity and reliability of maternal recall of breastfeeding practice. *Nutr Rev.* 2005;63(4):103-10.
 103. Agampodi SB, Fernando S, Dharmaratne SD, Agampodi TC. Duration of exclusive breastfeeding; validity of retrospective assessment at nine months of age. *BMC Pediatr.* 2011;11:80.
 104. Alayon S, Varela V, Mukuria-Ashe A, Alvey J, Milner E, Pedersen S, et al. Exclusive breastfeeding: Measurement to match the global recommendation. *Matern Child Nutr.* 2022;18(4):e13409.


105. Schneider BC, Cata-Preta BO, Graf DD, Silva D, Santos FS, Dias MS, et al. Validation of maternal recall on exclusive breastfeeding 12 months after childbirth. *Public Health Nutr.* 2020;23(14):2494-500.
106. Vyas S, Kumaranayake L. Constructing socio-economic status indices: how to use principal components analysis. *Health Policy Plan.* 2006;21(6):459-68.
107. Horta BL, Victora, Cesar G & World Health Organization. Short-term effects of breastfeeding: a systematic review on the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality: World Health Organization; 2013 [Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/95585>].
108. Chantry CJ, Howard CR, Auinger P. Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. *Pediatrics.* 2006;117(2):425-32.
109. WHO. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children Ginebra, Switzerland: WHO; 2014 [2nd:[Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112360/9789241548748_eng.pdf?sequence=1].
110. Di Comite A, Esposito S, Villani A, Stronati M, Italian Pediatric TB SG. How to manage neonatal tuberculosis. *J Perinatol.* 2016;36(2):80-5.
111. WHO. Breastfeeding and maternal tuberculosis: WHO; 1998 [Available from: https://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/pdfs/breastfeeding_and_maternal_tb.pdf?ua=1].
112. Lewinsohn DA, Gennaro ML, Scholvinck L, Lewinsohn DM. Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(5):658-74.
113. Gunasekera KS, Vonasek B, Oliwa J, Triasih R, Lancioni C, Graham SM, et al. Diagnostic Challenges in Childhood Pulmonary Tuberculosis-Optimizing the Clinical Approach. *Pathogens.* 2022;11(4).
114. Khanal V, Lee AH, Scott JA, Karkee R, Binns CW. Implications of methodological differences in measuring the rates of exclusive breastfeeding in Nepal: findings from literature review and cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2016;16(1):389.
115. Barbosa RW, Oliveira AE, Zandonade E, dos Santos Neto ET. Mothers' memory about breastfeeding and sucking habits in the first months of life for their children. *Revista Paulista de Pediatria.* 2012;30(2):180-6.
116. WHO. Indicators for assessing breast-feeding practices : report of an informal meeting, 11-12 June 1991, Geneva, Switzerland 1991 [Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/62134>].
117. WHO. Indicators for assessing infant and young child feeding practices: definitions and measurement methods: World Health Organization; 2021 [Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018389>].
118. UNICEF W. Indicators for assessing infant and young child feeding practices: Definitions and measurement methods Indicators for assessing infant and young child feeding practices: Definitions and measurement methods: World Health Organization; 2021 [Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340706>].

119. Greiner T. Exclusive breastfeeding: measurement and indicators. *Int Breastfeed J.* 2014;9:18.
120. Agampodi SB, Agampodi TC, de Silva A. Exclusive breastfeeding in Sri Lanka: problems of interpretation of reported rates. *Int Breastfeed J.* 2009;4:14.
121. Hector DJ. Complexities and subtleties in the measurement and reporting of breastfeeding practices. *Int Breastfeed J.* 2011;6:5.
122. Noel-Weiss J, Boersma S, Kujawa-Myles S. Questioning current definitions for breastfeeding research. *Int Breastfeed J.* 2012;7(1):9.
123. Aarts C, Kylberg E, Hornell A, Hofvander Y, Gebre-Medhin M, Greiner T. How exclusive is exclusive breastfeeding? A comparison of data since birth with current status data. *Int J Epidemiol.* 2000;29(6):1041-6.
124. Bland RM, Rollins NC, Solarsh G, Van den Broeck J, Coovadia HM, Child Health G. Maternal recall of exclusive breast feeding duration. *Arch Dis Child.* 2003;88(9):778-83.
125. Gillespie B, d'Arcy H, Schwartz K, Bobo JK, Foxman B. Recall of age of weaning and other breastfeeding variables. *Int Breastfeed J.* 2006;1:4.
126. Promislow JH, Gladen BC, Sandler DP. Maternal recall of breastfeeding duration by elderly women. *Am J Epidemiol.* 2005;161(3):289-96.
127. Chen Q, Galfalvy H, Duan N. Effects of disease misclassification on exposure-disease association. *Am J Public Health.* 2013;103(5):e67-73.
128. Dubale M, Tadesse M, Berhane M, Mekonnen M, Abebe G. Stool-based Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children at a teaching and referral hospital in Southwest Ethiopia. *PLoS One.* 2022;17(5):e0267661.
129. Kumar NP, Hissar S, Thiruvengadam K, Banurekha VV, Suresh N, Shankar J, et al. Discovery and Validation of a Three-Cytokine Plasma Signature as a Biomarker for Diagnosis of Pediatric Tuberculosis. *Front Immunol.* 2021;12:653898.
130. Lancella L, Vecchio AL, Chiappini E, Tadolini M, Cirillo D, Tortoli E, et al. How to manage children who have come into contact with patients affected by tuberculosis. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2015;1:1-12.
131. Palmeira P, Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2016;62(6):584-93.
132. Wake GE, Mittiku YM. Prevalence of exclusive breastfeeding practice and its association with maternal employment in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Int Breastfeed J.* 2021;16(1):86.
133. Schneider BC, Gatica-Dominguez G, Assuncao MCF, Matijasevich A, Barros AJD, Santos IS, et al. Introduction to complementary feeding in the first year of life and risk of overweight at 24 months of age: changes from 2004 to 2015 Pelotas (Brazil) Birth Cohorts. *Br J Nutr.* 2020;124(6):620-30.
134. Shamsedine L, Mailhac A, Badaoui A, El Hakim R, Kibbi R, Oueidat H, et al. Breastfeeding association with autism spectrum disorders: A case-control study from Lebanon. *Research in Autism Spectrum Disorders.* 2020;78:101651.
135. Ma J, Qiao Y, Zhao P, Li W, Katzmarzyk PT, Chaput JP, et al. Breastfeeding and childhood obesity: A 12-country study. *Matern Child Nutr.* 2020;16(3):e12984.
136. Tariku A, Alemu K, Gizaw Z, Muchie KF, Derso T, Abebe SM, et al. Mothers' education and ANC visit improved exclusive breastfeeding in Dabat

- Health and Demographic Surveillance System Site, northwest Ethiopia. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179056.
137. Asfaw MM, Argaw MD, Kefene ZK. Factors associated with exclusive breastfeeding practices in Debre Berhan District, Central Ethiopia: a cross sectional community based study. *Int Breastfeed J*. 2015;10:23.
138. Jones JR, Kogan MD, Singh GK, Dee DL, Grummer-Strawn LM. Factors associated with exclusive breastfeeding in the United States. *Pediatrics*. 2011;128(6):1117-25.
139. Melese Ayele W. Exclusive Breastfeeding and Normative Belief among Rural Mothers in Ethiopia, 2019: A Cross-Sectional Survey Embedded with Qualitative Design. *Obstet Gynecol Int*. 2021;2021:5587790.
140. Kandeel WA, Rabah TM, Zeid DA, El-Din EMS, Metwally AM, Shaalan A, et al. Determinants of Exclusive Breastfeeding in a Sample of Egyptian Infants. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1818-23.

XI. ANEXOS

10.1 Anexo 1: Aprobación ética previa



UNIVERSIDAD
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA 535-24-18

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**.

Título del Proyecto : "Tuberculosis pediátrica: Evaluación del desempeño diagnóstico de dos muestras biológicas en un ensayo molecular y asociación entre la lactancia materna exclusiva y la tuberculosis activa".

Código de inscripción : 102888

Investigador principal : Flores Tumba, Juan Antonio

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

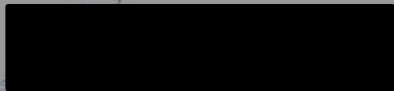
1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 08 de noviembre del 2018.


La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión de presente documento hasta el **07 de noviembre del 2019**.

Si aplica, los tramites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 08 de noviembre del 2018.


Dra. Irene Samalvides Cuba
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación



XI.1 Anexo 2: Instrumento(s) de recolección de los datos

*CRF BK y Cultivo en niño

BK y Cultivo - Niño

BKCU

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: right;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>		--				--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a	a
	--				--	2	0														
d	d	m	m	a	a	a	a	a	a												

1.	¿Se realizó la Revisión de Historia Clínica?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No, especificar razón: (Fin)																				
2.	¿Hay resultados de baciloscopia (BK)?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 8)																				
3.	Laboratorio	<input type="checkbox"/> MINS <input type="checkbox"/> SES <input type="checkbox"/> Otro: (especificar) _____																				
4.	Número de registro	_____																				
5.	¿Tiene fecha de colección?	<input type="checkbox"/> Si (registrar fecha) <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table> <input type="checkbox"/> No		--				--					d	d	m	m	a	a	a	a	a	a
	--				--																	
d	d	m	m	a	a	a	a	a	a													
6.	Resultado	<input type="checkbox"/> (+) <input type="checkbox"/> (++) <input type="checkbox"/> (+++) <input type="checkbox"/> ___ BAAR por 100 campos <input type="checkbox"/> BK (-)																				
7.	¿Tiene fecha de resultado?	<input type="checkbox"/> Si (registrar fecha) <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table> <input type="checkbox"/> No		--				--					d	d	m	m	a	a	a	a	a	a
	--				--																	
d	d	m	m	a	a	a	a	a	a													

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: center;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td>--</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td></td><td>m</td><td>m</td><td>m</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--			--	2	0			d	d		m	m	m	a	a	a	a
		--			--	2	0														
d	d		m	m	m	a	a	a	a												

8.	¿Hay resultados de Cultivo?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (fin)																				
9.	Laboratorio	<input type="checkbox"/> MINSA <input type="checkbox"/> SES <input type="checkbox"/> Otro: (especificar) _____																				
10.	Número de registro	_____																				
11.	¿Tiene fecha de colección?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 13)																				
12.	Fecha de colección	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td></td><td>m</td><td>m</td><td>m</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--			--					d	d		m	m	m	a	a	a	a
		--			--																	
d	d		m	m	m	a	a	a	a													
13.	Resultado	<input type="checkbox"/> (+) <input type="checkbox"/> (++) <input type="checkbox"/> (+++) <input type="checkbox"/> ___ Colonias <input type="checkbox"/> C (-) <input type="checkbox"/> Contaminado <input type="checkbox"/> Positivo																				
14.	¿Tiene fecha de resultado?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (fin)																				
15.	Fecha de Resultado	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td></td><td>m</td><td>m</td><td>m</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--			--					d	d		m	m	m	a	a	a	a
		--			--																	
d	d		m	m	m	a	a	a	a													

***RCF Detalles del caso índice - niño**

Detalles del Caso Índice - Niño

SCDE

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: center;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td>--</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td></td><td>m</td><td>m</td><td></td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--			--	2	0			d	d		m	m		a	a	a	a
		--			--	2	0														
d	d		m	m		a	a	a	a												

1.	¿Se realizó Detalles del Caso Índice?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No, especificar razón: (Fin)		
2.	¿Tiene un contacto conocido que actualmente tiene TB?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
3.	Género del caso índice	<input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
4.	Edad del caso índice	<table style="display: inline-table; border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; vertical-align: middle;"> <tr><td> </td><td> </td></tr> </table> <input type="checkbox"/> Meses <input type="checkbox"/> Años		
5.	¿Con qué frecuencia el caso índice bebe alcohol?	<input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> A veces <input type="checkbox"/> Frecuentemente <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
6.	¿Con qué frecuencia el caso índice fuma?	<input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/> A veces <input type="checkbox"/> Frecuentemente <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
7.	¿El caso índice tuvo un caso confirmado de TB MDR?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No aplica <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		

***CRF Escala de exposición detallada - niño**

Escala de Exposición Detallada - Niño

DEXS

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: right;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>		--			--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a
	--			--	2	0													
d	d	m	m	a	a	a	a	a											

1.	¿Se realizó Escala de Exposición Detalla?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No, especificar razón: _____ _____ (Fin)
2.	¿El caso índice es la madre del niño?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
3.	¿El caso índice es el cuidador principal del niño?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
4.	¿Por lo general, el caso índice duerme en la misma cama que el niño?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
5.	¿Por lo general, el caso índice duerme en la misma habitación que el niño?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
6.	¿El caso índice tiene tos?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
7.	¿El caso índice dice tener TB pulmonar?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe

Escala de Exposición Detallada - Niño

DEXS

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td>--</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td></td><td>m</td><td>m</td><td></td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--			--	2	0			d	d		m	m		a	a	a	a
		--			--	2	0														
d	d		m	m		a	a	a	a												

8.	¿El caso índice tiene baciloscopia positiva?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
9.	¿El caso índice vive en el mismo domicilio que el niño?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
10.	¿El caso índice está con el niño todos los días?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
11.	¿Hay más de un adulto con TB en el domicilio del niño?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe

***CRF Inseguridad alimentaria en el domicilio – niños**

Inseguridad Alimentaria en el Domicilio - Niño

HHFI

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td>m</td><td>m</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> </table>													d	d	m	m	a	a	a	a	2	0		
d	d	m	m	a	a	a	a	2	0																

1.	¿Se realizó Inseguridad Alimentaria en el Domicilio?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No, especificar razón: _____ _____ (Fin)		
2.	¿Fue amamantado el niño alguna vez?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 5) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 5) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 5)		
3.	¿Hasta qué edad fue amamantado?	<table border="1" style="display: inline-table; width: 40px; height: 20px; vertical-align: middle;"> <tr><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td></tr> </table> <input type="checkbox"/> Días <input type="checkbox"/> Meses <input type="checkbox"/> Años		
4.	¿Hasta qué edad amamantó al niño exclusivamente (sin otros alimentos o líquidos)?	<table border="1" style="display: inline-table; width: 40px; height: 20px; vertical-align: middle;"> <tr><td style="width: 20px;"> </td><td style="width: 20px;"> </td></tr> </table> <input type="checkbox"/> Días <input type="checkbox"/> Meses <input type="checkbox"/> Años		
5.	En los últimos 12 meses, ¿cuántos meses ha estado preocupado porque los alimentos en el domicilio podrían agotarse antes de poder conseguir más?	<input type="checkbox"/> Casi todos los meses (8 – 12 meses) <input type="checkbox"/> Algunos meses (entre 3 y 7 meses) <input type="checkbox"/> Sólo 1 o 2 meses <input type="checkbox"/> No sucedió <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
6.	En los últimos 12 meses, ¿cuántos meses la comida que compró no duró lo suficiente y no había dinero para conseguir más?	<input type="checkbox"/> Casi todos los meses (8 – 12 meses) <input type="checkbox"/> Algunos meses (entre 3 y 7 meses) <input type="checkbox"/> Sólo 1 o 2 meses <input type="checkbox"/> No sucedió <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		

Inseguridad Alimentaria en el Domicilio - Niño

HHFI

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: right;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td></td> <td>m</td> <td>m</td> <td>m</td> <td></td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>			--				--	2	0			d	d		m	m	m		a	a	a	a
		--				--	2	0															
d	d		m	m	m		a	a	a	a													

18.	<p>En los últimos 12 meses, ¿alguna vez ha sentido hambre pero no comió porque no alcanzaba la comida en el domicilio?</p>	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
19.	<p>En los últimos 12 meses, ¿bajó de peso porque no alcanzaba la comida en el domicilio?</p>	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
20.	<p>¿Cuál de las siguientes frases describe mejor la situación alimentaria en su domicilio durante los últimos 12 meses?</p>	<input type="checkbox"/> Siempre comemos tanto como cuánto queremos <input type="checkbox"/> Comemos lo suficiente, pero no siempre lo que nos gustaría <input type="checkbox"/> A veces no comemos lo suficiente <input type="checkbox"/> Con frecuencia no comemos lo suficiente <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe

***CRF Lectura de PPD – niño**

Lectura de PPD - Niño

PPDL

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td> </td><td>--</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td></td><td>m</td><td>m</td><td>m</td><td></td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--				--	2	0			d	d		m	m	m		a	a	a	a
		--				--	2	0															
d	d		m	m	m		a	a	a	a													

1.	¿Se realizó Lectura de PPD?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No, especificar razón: _____ _____ (Fin)																				
2.	Fecha de lectura de la aplicación de PPD	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td></td><td>m</td><td>m</td><td>m</td><td></td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--								d	d		m	m	m		a	a	a
		--																				
d	d		m	m	m		a	a	a													
3.	¿Cuenta con la hora de aplicación de PPD?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 5)																				
4.	Hora de lectura de la aplicación de PPD	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>:</td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			:																	
		:																				
5.	¿Conoce el brazo de aplicación de PPD?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 7)																				
6.	Brazo en el que se realiza la lectura	<input type="checkbox"/> Derecho <input type="checkbox"/> Izquierdo																				
7.	Resultado	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td> </tr> </table> mm																				
8.	Iniciales de la persona que realiza la lectura	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>																				

***CRF Revisión de radiografía de tórax – niño**

Revisión de Radiografía de Tórax - Niño

CXRR

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td>--</td><td> </td><td>--</td><td>20</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td> <td>m</td><td>m</td> <td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>		--		--	20			d	d	m	m	a	a	a
	--		--	20											
d	d	m	m	a	a	a									

1.	¿Se realizó la Revisión de Radiografía de tórax?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No, especificar razón: _____ _____ (Fin)														
2.	Tipo de placa radiográfica	<input type="checkbox"/> Frontal <input type="checkbox"/> Lateral <input type="checkbox"/> Frontal/Lateral														
3.	Fecha de la placa	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td>--</td><td> </td><td>--</td><td>20</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td> <td>m</td><td>m</td> <td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>		--		--	20			d	d	m	m	a	a	a
	--		--	20												
d	d	m	m	a	a	a										
4.	Fecha de lectura de la placa	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td>--</td><td> </td><td>--</td><td>20</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td> <td>m</td><td>m</td> <td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>		--		--	20			d	d	m	m	a	a	a
	--		--	20												
d	d	m	m	a	a	a										
5.	Iniciales del responsable de la lectura	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>														
6.	Incidencia	<input type="checkbox"/> Antero posterior <input type="checkbox"/> Postero anterior <input type="checkbox"/> Lordótica <input type="checkbox"/> Lateral <input type="checkbox"/> Otro (especificar): _____														
7.	Identificación	<input type="checkbox"/> AP/PA legible <input type="checkbox"/> AP/PA ilegible <input type="checkbox"/> Lateral legible <input type="checkbox"/> Lateral ilegible <input type="checkbox"/> Otro (especificar): _____														
8.	Inspiración	<input type="checkbox"/> AP/PA legible <input type="checkbox"/> AP/PA ilegible <input type="checkbox"/> Lateral legible														

Revisión de Radiografía de Tórax - Niño

CXRR

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>		--			--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a
	--			--	2	0													
d	d	m	m	a	a	a	a	a											

		<input type="checkbox"/> Lateral ilegible <input type="checkbox"/> Otro (especificar): _____
9.	Rotación	<input type="checkbox"/> AP/PA legible <input type="checkbox"/> AP/PA ilegible <input type="checkbox"/> Lateral legible <input type="checkbox"/> Lateral ilegible <input type="checkbox"/> Otro (especificar): _____
10.	Penetración	<input type="checkbox"/> AP/PA legible <input type="checkbox"/> AP/PA ilegible <input type="checkbox"/> Lateral legible <input type="checkbox"/> Lateral ilegible <input type="checkbox"/> Otro (especificar): _____
11.	Consolidación Lobar	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 13)
12.	Localización	<input type="checkbox"/> AP/PA zona superior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona media derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona superior izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona media izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior izquierda <input type="checkbox"/> Lateral zona superior <input type="checkbox"/> Lateral zona media <input type="checkbox"/> Lateral zona inferior
13.	Bronconeumónico	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 15)
14.	Localización	<input type="checkbox"/> AP/PA zona superior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona media derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona superior izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona media izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior izquierda <input type="checkbox"/> Lateral zona superior

Revisión de Radiografía de Tórax - Niño

CXRR

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td> </td><td>--</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td>m</td><td>m</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>			--				--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a	a	a
		--				--	2	0															
d	d	m	m	a	a	a	a	a	a	a													

		<input type="checkbox"/> Lateral zona media <input type="checkbox"/> Lateral zona inferior
15.	Foco de Ghon	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 17)
16.	Localización	<input type="checkbox"/> AP/PA zona superior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona media derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona superior izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona media izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior izquierda <input type="checkbox"/> Lateral zona superior <input type="checkbox"/> Lateral zona media <input type="checkbox"/> Lateral zona inferior
17.	Caverna	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 19)
18.	Localización	<input type="checkbox"/> AP/PA zona superior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona media derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona superior izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona media izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior izquierda <input type="checkbox"/> Lateral zona superior <input type="checkbox"/> Lateral zona media <input type="checkbox"/> Lateral zona inferior
19.	Cambios Intersticiales	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 21)
20.	Localización	<input type="checkbox"/> AP/PA zona superior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona media derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior derecha <input type="checkbox"/> AP/PA zona superior izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona media izquierda <input type="checkbox"/> AP/PA zona inferior izquierda <input type="checkbox"/> Lateral zona superior

***CRF Síntomas – niño**

Síntomas - Niño

SINT

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td> </td><td>--</td><td> </td><td> </td><td>--</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td>m</td><td>m</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			--			--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a		
		--			--	2	0														
d	d	m	m	a	a	a	a														

1.	¿Se realizó evaluación de síntomas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No, especificar razón: _____ _____ (Fin)			
2.	¿Ha tenido dolor de pecho durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 4) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 4) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 4)			
3.	Número de días con dolor de pecho	<table border="1" style="width: 30px; height: 20px;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			
4.	¿Ha tenido dificultad para respirar (falta de aire) durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 6) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 6) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 6)			
5.	Número de días con dificultad para respirar	<table border="1" style="width: 30px; height: 20px;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			
6.	¿Ha tenido pérdida de apetito durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 8) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 8) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 8)			
7.	Número de días con pérdida de apetito	<table border="1" style="width: 30px; height: 20px;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			
8.	¿Ha tenido sudoración nocturna (sudoración regular que humedece o moja su ropa de dormir o que requiere un cambio de ropa de dormir) durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 10) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 10) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 10)			

Síntomas - Niño

SINT

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: center;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;">--</td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;">--</td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;">2</td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;">0</td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">d</td> <td style="text-align: center;">d</td> <td></td> <td style="text-align: center;">m</td> <td style="text-align: center;">m</td> <td></td> <td style="text-align: center;">a</td> <td style="text-align: center;">a</td> <td style="text-align: center;">a</td> <td style="text-align: center;">a</td> </tr> </table>			--			--	2	0			d	d		m	m		a	a	a	a
		--			--	2	0														
d	d		m	m		a	a	a	a												

9.	Número de días con sudoración nocturna	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> </table>			
10.	¿Ha tenido vómitos durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 12) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 12) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 12)			
11.	Número de días con vómitos	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> </table>			
12.	¿Ha tenido diarrea durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 14) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 14) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 14)			
13.	Número de días con diarrea	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> </table>			
14.	¿Ha tenido náuseas durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 16) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 16) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 16)			
15.	Número de días con náusea	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> </table>			
16.	¿Ha expectorado sangre durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 18) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 18) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 18)			
17.	Número de veces de expectoración con sangre	<table style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> </table>			

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: right;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>		--			--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a
	--			--	2	0													
d	d	m	m	a	a	a	a	a											

18.	¿Ha tenido dificultades para dormir durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 20) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 20) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 20)			
19.	Número de días con dificultades para dormir	<table border="1" style="width: 60px; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
20.	¿Ha sentido debilidad durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 22) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 22) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 22)			
21.	Número de días con debilidad	<table border="1" style="width: 60px; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
22.	¿Ha tenido congestión nasal durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 23) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 23) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 23)			
23.	Número de días con congestión nasal	<table border="1" style="width: 60px; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
24.	¿Ha tenido rinorrea (secreción líquida transparente) durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 26) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 26) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 26)			
25.	Número de días con rinorrea	<table border="1" style="width: 60px; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
26.	¿Ha tenido secreción nasal (secreción mucosa amarillenta) durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 28) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 28) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 28)			

Síntomas - Niño

SINT

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>		--			--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a
	--			--	2	0													
d	d	m	m	a	a	a	a	a											

36.	¿Ha tenido dolor de costillas durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 38) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 38) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 38)			
37.	Número de días con dolor de costillas	<table border="1" style="width: 60px; height: 25px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
38.	¿Ha tenido ronquera durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 40) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 40) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 40)			
39.	Número de días con ronquera	<table border="1" style="width: 60px; height: 25px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
40.	¿Ha tenido conjuntivitis durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 42) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 42) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 42)			
41.	Número de días con conjuntivitis	<table border="1" style="width: 60px; height: 25px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
42.	¿Ha tenido dolor de cuerpo durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 44) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 44) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 44)			
43.	Número de días con dolor de cuerpo	<table border="1" style="width: 60px; height: 25px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			
44.	¿Ha tenido dolor sinusal durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 46) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 46) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 46)			

Síntomas - Niño

SINT

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: center;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td> </td><td>--</td><td> </td><td>--</td><td>2</td><td>0</td><td> </td><td> </td> </tr> <tr> <td>d</td><td>d</td><td>m</td><td>m</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td><td>a</td> </tr> </table>		--		--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a
	--		--	2	0												
d	d	m	m	a	a	a	a										

45.	Número de días con dolor sinusal	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			
46.	¿Ha tenido dolor de cabeza durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 48) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 48) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 48)			
47.	Número de días con dolor de cabeza	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			
48.	¿Ha tenido alergia/rinitis alérgica durante las últimas 4 semanas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (fin) <input type="checkbox"/> Rehusó (fin) <input type="checkbox"/> No sabe (fin)			
49.	Número de días con alergia/rinitis alérgica	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: center;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>			--			--	2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a	a
		--			--	2	0														
d	d	m	m	a	a	a	a	a	a												

		<input type="checkbox"/> Madre de Dios <input type="checkbox"/> Moquegua <input type="checkbox"/> Pasco <input type="checkbox"/> Piura <input type="checkbox"/> Puno <input type="checkbox"/> San Martín <input type="checkbox"/> Tacna <input type="checkbox"/> Tumbes <input type="checkbox"/> Ucayali
5.	Número de personas que viven en el domicilio (incluyendo al participante)	<input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/>
6.	De estas personas, cuántos son < 18 años (incluyendo al participante)	<input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/>
7.	Sin incluir el baño, los pasillos, la cocina o el garaje, ¿cuántas habitaciones tiene su domicilio?	<input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/>
8.	¿Cuántas de las habitaciones se usan para dormir?	<input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/>
9.	Número de ventanas con vista hacia el exterior	<input style="width: 30px;" type="text"/> <input style="width: 30px;" type="text"/>
10.	¿Tiene televisor?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
11.	¿Tiene refrigerador?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe
12.	¿Tiene teléfono convencional?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe

<p>ID del participante:</p> <p style="text-align: right;">(pegar sticker)</p>	<p>Fecha de Intervención:</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">-</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">-</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td>m</td> <td>m</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>		-		-			2	0			d	d	m	m	a	a	a	a	a	a
	-		-			2	0														
d	d	m	m	a	a	a	a	a	a												

13.	¿Tiene celular?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
14.	¿Tiene vehículo de motor?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 16) <input type="checkbox"/> Rehusó (pase a la pregunta 16) <input type="checkbox"/> No sabe (pase a la pregunta 16)		
15.	¿Cuántos vehículos tiene?	<table border="1" style="display: inline-table; width: 40px; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>		
16.	¿Tiene lavadora?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
17.	¿Tiene microondas?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
18.	¿Tiene agua corriente (potable)?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
19.	¿Hay baño dentro del domicilio?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		
20.	¿Tiene computadora?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe		

Socio Demográfico - Niño

SODE

ID del participante: (pegar sticker)	Fecha de Intervención: <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">--</td> <td style="width: 20px;">2</td> <td style="width: 20px;">0</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>d</td> <td></td> <td>m</td> <td>m</td> <td></td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> <td>a</td> </tr> </table>			--			--	2	0			d	d		m	m		a	a	a	a
		--			--	2	0														
d	d		m	m		a	a	a	a												

21.	¿Actualmente el niño asiste a la escuela?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No (pase a la pregunta 23) <input type="checkbox"/> No aplica (fin) <input type="checkbox"/> Rehusó (fin) <input type="checkbox"/> No sabe (fin)
22.	Nivel de estudios cursando actualmente	<input type="checkbox"/> Inicial / Jardín de niños (fin) <input type="checkbox"/> Estudios primarios (fin) <input type="checkbox"/> Estudios secundarios (fin) <input type="checkbox"/> Rehusó (fin) <input type="checkbox"/> No sabe (fin)
23.	Nivel máximo de educación obtenido	<input type="checkbox"/> Inicial / Jardín de niños terminado <input type="checkbox"/> Inicial / Jardín de niños no terminado <input type="checkbox"/> Estudios primarios terminados <input type="checkbox"/> Estudios primarios no terminados <input type="checkbox"/> Estudios secundarios terminados <input type="checkbox"/> Estudios secundarios no terminados <input type="checkbox"/> Ninguno <input type="checkbox"/> Rehusó <input type="checkbox"/> No sabe

10.2 Anexo 3: Consentimiento informado, asentimiento informado

El estudio primario contó con consentimiento informado y asentimiento informado que fue aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes. Para las dos investigaciones de la tesis, no se realizaron nuevos consentimientos o asentimientos a los participantes. Sin embargo, el análisis realizado en ambas investigaciones de esta tesis contó con la aprobación ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia descrito en el Anexo 1.

10.3 Anexo 4: Otros anexos

Apéndice 1

Componentes de la leche materna (131)

Componentes solubles	Componentes celulares	Microbiota
Anticuerpos (especialmente IgA secretoria)	104 a 10 ⁶ células/mL en el calostro 105 células/mL en leche madura	8 x 10 ⁴ a 8 x 10 ⁶ bacterias/800mL/día
Componentes secretorios libres	Neutrófilos	<u>Principales géneros</u>
Lisozima	Macrófagos	<i>Lactobacillus</i>
Lactoferrina	Células T CD4+	<i>Staphylococcus</i>
k-caseína	Células T CD8+	<i>Streptococcus</i>
A-Lactoglobulina	Células T γδ	<i>Enterococcus</i>
Haptocorrina (Proteína R)	Células B	<i>Bifidobacterium</i>
Osteoprotegerina	Células NK	<i>Kocuria</i>
sCD14	Células epiteliales	<i>Lactococcus</i>
Hormonas		<i>Leuconostoc</i>
Factores de crecimiento (CSF's, M-CSF, GM-CSF) (81)		<i>Pediococcus</i>
Citocinas (IL 1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IL15, IL17, IL18, TNF α, IFN-γ. 2010 (81, 82) y quimosinas (CXC quimosinas y CC quimosinas) (81)		<i>Propionibacterium</i>
Lípidos		<i>Rothia</i>
Ácidos nucleicos		<i>Weissella</i>
Oligosacáridos		
Factores antioxidantes		

Apéndice 2.

Variables categóricas del hogar incluidas en el PCA para calcular el índice socioeconómico. (n=278)*

El hogar tiene alguno de los siguientes elementos	Total n (%)	TB diagnosticada	
		Si (N=61) n (%)	No (N=217) n (%)
Baño en casa	242 (87)	46 (75)	196 (90)
Celular	241 (87)	50 (82)	191 (88)
Computadora	66 (24)	14 (23)	52 (24)
Microondas	91 (33)	19 (31)	72 (33)
Teléfono convencional	65 (24)	10 (16)	55 (25)
Agua potable	250 (90)	49 (80)	201 (93)
Refrigerador	198 (71)	36 (59)	162 (75)
Televisión	273 (98)	59 (97)	214 (99)
Vehículo motorizado	31 (11)	5 (8)	26 (12)
Lavadora	132 (48)	30 (49)	102 (47)
>1 ventanas al exterior	147 (53)	29 (48)	118 (54)
>1 habitaciones	211 (76)	45 (74)	166 (77)
Índice socioeconómico calculado	-0.05 (2.8) [£]	-0.15 (3.7) [£]	-0.02 (2.4) [£]

* Un participante tuvo datos perdidos para todas las variables incluidas.

£ Mediana (IQR)

Abreviación: PCA= análisis de componentes principales

Apéndice 3

Tabla 1. Estudios publicados que incluyen mediciones retrospectivas de la lactancia materna exclusiva

#	Año	País	Título de artículo	Cuartil de la revista	Edad de los niños	Tipo de pregunta o forma de medir Lactancia exclusiva	Referencia
1	2022	Bangladesh, Vietnam y Nigeria	Exclusive breastfeeding: Measurement to match the global recommendation	Q1	6 - <12 meses	No establecido. Pero la medición retrospectiva es definida como el porcentaje de niños entre 6-11.9 meses que no consumieron otro alimento más que la leche materna en los 6 primeros meses de vida.	(104)
2	2021	Etiopía	Prevalence of exclusive breastfeeding practice and its association with maternal employment in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis	Q1	<5 años	No es establecido (Revisión sistemática)	(132)
3	2020	Brasil	Validation of maternal recall on exclusive breastfeeding 12 months after childbirth	Q1	<12 meses	Ahora, de acuerdo a la siguiente lista (de comidas y líquidos), por favor responda si Ud. ha iniciado en darle alguno de ellas a su niño. Si Ud. ya inició en darle alguno de los alimentos de la lista a su niño, ¿cuándo Ud. inició en brindarle dicho alimento?	(133)

4	2020	Líbano	Breastfeeding association with autism spectrum disorders: A case-control study from Lebanon	Q1	18 meses – 3 años	Duración de lactancia exclusiva, duración de lactancia mixta, edad de introducción de sólidos	(134)
5	2020	12 países: 5 continentes	Breastfeeding and childhood obesity: A 12-country study	Q1	9-11 años	¿El niño fue lactado?, edad en la que dejó de ser lactado, edad cuando el niño usó fórmula, edad cuando el niño dejó de usar fórmula.	(135)
6	2017	Etiopía	Mothers' education and ANC visit improved exclusive breastfeeding in Dabat Health and Demographic Surveillance System Site, northwest Ethiopia	Q1	<5 años	¿Cuándo fue la primera vez que se introdujo algún sólido, semisólido o fluido al niño en adición a la leche materna?	(136)
7	2015	Etiopía	Factors associated with exclusive breastfeeding practices in Debre Berhan District, Central Ethiopia: a cross sectional community based study	Q1	<12 meses	Se midió el tiempo de iniciación de la lactancia y la duración de la lactancia materna exclusiva	(137)
8	2011	USA	Factors Associated With Exclusive Breastfeeding in the United States	Q1	6 meses – 5 años	¿El niño ha sido amamantado alguna vez con leche materna? ¿Qué edad tenía el niño cuando dejó de ser amamantado? ¿Qué edad tuvo el niño cuando por primera vez usó fórmula? Qué edad tuvo el niño cuando fue alimentado con otra cosa aparte de la leche materna o fórmula?	(138)

9	2011	Sri Lanka	Duration of exclusive breastfeeding; validity of retrospective assessment at nine months of age	Q1	<9 meses de edad	¿Ud. proveyó algún alimento (de una lista pre-establecida de comidas y bebidas) al niño? de serlo, ¿En qué fecha Ud. le proveyó el alimento al niño y en qué frecuencia? ¿A qué edad Ud. Discontinúo la lactancia materna exclusiva en el niño?	(103)
10	2005	Revisión de publicaciones 1966-2003	The Validity and Reliability of Maternal Recall of Breastfeeding Practice	Q1	6 meses – 51 años	No establecido. Pero se analizó la LME como la edad en que se introdujo otros fluidos o líquidos diferentes a la leche materna.	(102)
11	2021	Etiopía	Exclusive Breastfeeding and Normative Belief among Rural Mothers in Ethiopia, 2019: A Cross-Sectional Survey Embedded with Qualitative Design	Q2	<2 años (80% > 6 meses)	La pregunta giró en torno a si el niño recibió lactancia materna exclusiva por 6 meses o si recibió alimentación complementaria en los 6 meses.	(139)
12	2018	Egipto	Determinants of Exclusive Breastfeeding in a Sample of Egyptian Infants	Q3	6 – 24 meses	La pregunta giró en torno a si el niño recibió lactancia materna exclusiva por 6 meses o alimentación artificial en el mismo período.	(140)