



ARTÍCULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

IDENTIFICACIÓN DE NO MICOBACTERIAS, MICOBACTERIAS ATÍPICAS Y *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MEDIANTE UN NUEVO PROTOCOLO MICROBIOLÓGICO

IDENTIFICATION OF NON-MYCOBACTERIA, ATYPICAL MYCOBACTERIA AND *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY A NEW MICROBIOLOGICAL PROTOCOL

Jesús Rojas J.

Laboratorios de investigación y Desarrollo, División de Micobacterias. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
Av. Honorio Delgado 430 Urb. Ingeniería San Martín de Porres, Lima, Perú. Teléfono: (511)-5426654.
Correo electrónico: fago200179@yahoo.es

The Biologist (Lima) 9(1): 9-18.

ABSTRACT

Tuberculosis is a major pandemic disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. There are also other bacteria that cause clinically similar patterns leading to a misinterpretation in the identification in the laboratory. Therefore it is necessary to introduce a new protocol to correctly identify pathogens in samples in the microbiology laboratory. ATP1084, TCD007 and LS (*M. tuberculosis*) samples were used. Staining was performed with Ziehl-Neelsen (ZN) and auramine. Cultures used were MOD (Middle Microscopic Observation for Tuberculosis), LJ (Lowenstein-Jensen) and 7H11 solid medium. ATP1084 and TCD007 samples showed similar patterns on auramine staining, cultivation 7H11 and MOD in early growth, but showed different characteristics in ZN staining and culture of LJ. TCD007, ATP1084 and LS were compared with growth time discriminating between MOD but with a shape similar to the colonies. Although culture in liquid media like MOD has a high sensitivity and specificity, the presence of cord formation is considered a feature for LS. In some cases, different bacteria have a similar morphology LS medium even MOD. However, a key point is to use the culture time, ZN staining and the LJ culture to discriminate whether they are atypical mycobacteria or not, tuberculosis by LS. ATP1084, TCD007 and LS were identified as a non-alcohol acid resistant mycobacteria, atypical mycobacteria and *M. tuberculosis*, respectively.

Keywords: colonies, mycobacterium, *Mycobacterium*, tuberculosis.

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad pandémica importante causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Además existen otras bacterias que causan patrones similares en la clínica llevando a una mala interpretación en la identificación en los laboratorios. Por lo tanto, es necesario introducir un nuevo protocolo con el fin de identificar correctamente los agentes patógenos en muestras en el laboratorio microbiológico. Se utilizaron las muestras ATP1084, TCD007 y LS (*M. tuberculosis*). Se realizaron tinciones con Ziehl-Neelsen (ZN) y auramina. Se emplearon los cultivos en medio MOD (Medio de Observación Microscópica para Tuberculosis), en LJ (Lowenstein-Jensen) y en medio sólido 7H11. Las muestras ATP1084 y TCD007 mostraron patrones similares en la tinción auramina, cultivo MOD y cultivo 7H11 con un crecimiento

temprano, pero mostraron características diferentes en tinciones con ZN y en cultivo de LJ. ATP1084 y TCD007 se compararon con LS discriminando el tiempo de crecimiento en medio MOD aunque con una forma similar para las colonias. Aunque el cultivo en medios líquidos como el MOD tiene una alta sensibilidad y especificidad; la presencia de la formación de cuerda se considera una característica para LS. En algunos casos, las bacterias diferentes a LS presentan una morfología similar aún en el medio MOD. Sin embargo, un punto clave es utilizar el tiempo de cultivo, la tinción ZN y el cultivo LJ con el fin de discriminar micobacterias atípicas o no, de la tuberculosis por LS. ATP1084, TCD007 y LS fueron identificadas como una no micobacteria alcohol ácido resistente, una micobacteria atípica y *M. tuberculosis*, respectivamente.

Palabras claves: colonias, micobacteria, *Mycobacterium*, tuberculosis.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades más terribles en todo el mundo debido a la alta prevalencia de la enfermedad y su facilidad de propagación. La enfermedad se declara como un problema mundial porque la tuberculosis es ampliamente distribuida. Esta aparece con más frecuencia en estándares sanitarios pobres, pero también se produce en las zonas con altas medidas de saneamiento (Palomino *et al.* 2007).

Parte de la información muestra que una persona se infecta por el bacilo de la tuberculosis cada segundo. En términos generales un tercio de la población mundial está actualmente infectada por el bacilo de la tuberculosis (Palomino *et al.* 2007). Cuatro cepas: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. canetti*, dan lugar a un cuadro clínico idéntico. Otras pocas micobacterias, como *M. avium* y *M. kansasii*, también pueden inducir una infección pulmonar granulomatosa, con frecuencia. Estas micobacterias se cuentan como las micobacterias atípicas (Nerlich & Losch 2009).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) está compuesto por varias especies estrechamente relacionadas, responsables de enfermedades estrictamente humanas y zoonóticas. Además de *M. tuberculosis*, que representa la principal causa de la tuberculosis en todo el mundo humano, ahora están surgiendo cepas de tuberculosis extremadamente resistentes a los medicamentos. Otras especies del MTC se han encontrado en los pacientes, especialmente en los países africanos. *M. bovis* es una re-emergente y es el agente zoonótico de la tuberculosis bovina, cuya prevalencia probablemente depende de las variaciones en la exposición directa a la ganadería y el consumo de productos lácteos no pasteurizados. La prevalencia de *M. africanum* tipo I (África Occidental) y tipo II (África Oriental) ha disminuido en varios países africanos en las últimas décadas.

Mycobacterium canettii es una especie rara del MTC, que se ha aislado recientemente en pacientes en África. *Mycobacterium microti*, un patógeno de pequeños roedores de campo que está estrechamente relacionado con el llamado bacilo de Dassie e infecta a mamíferos pequeños en el sur de África y

Oriente Medio, ha sido también aislado en humanos. *Mycobacterium caprae* es una causa poco frecuente de la tuberculosis en el ganado y de tuberculosis zoonóticas en humanos. *Mycobacterium pinnipedii* se ha aislado de leones marinos y focas. Una descripción reciente de la reaparición de *M. bovis* en el ganado vacuno, junto con la transmisión interhumana directa de este organismo zoonótico, incluyó una muerte en el Reino Unido, lo cual ilustra el potencial de las enfermedades emergentes y reemergentes zoonóticas (Djelouadji *et al.* 2008). *Mycobacterium avium* es la principal especie del complejo de micobacterias no tuberculosas (NTM) identificadas en algunos casos (Dos Santos *et al.* 2008).

El diagnóstico basado únicamente en la presentación clínica es poco confiable, por ejemplo, en pacientes infectados por VIH con enfermedad diseminada, presentan síntomas sistémicos, como fiebre, pérdida de peso y anorexia. El tratamiento de las infecciones por diferentes genotipos de *M. tuberculosis* puede requerir un manejo diferente de lucha contra la tuberculosis (Kremer *et al.* 2009).

Los laboratorios están utilizando muchas técnicas para detectar *M. tuberculosis*, los que incluyen tinción en baciloscopía, cultivo en medios Lowenstein Jensen (LJ), 7H9 y 7 H11 y MODS (Palomino *et al.* 2007, Shiferaw *et al.* 2007). Algunas de las técnicas no son prácticas porque son demasiado complejas o por el costo prohibitivo. El diagnóstico de la tuberculosis activa todavía se basa principalmente en la constatación directa de los bacilos de la tuberculosis, ya sea en frotis de esputo o en cultivo. Los procedimientos que son operador-dependiente no son lo suficientemente sensibles como para detectar más del 65% y el 70% de la carga bacteriana en la enfermedad (Kashino *et al.* 2008).

Las comparaciones de la tuberculosis se debe hacer con precaución debido a que las diferencias en el muestreo, la selección de estrategias y los métodos de laboratorio utilizados tanto en los procedimientos de frotis y cultivo, en comparaciones directas son difíciles, porque en los estudios mostraron un frotis negativo, pero cultivo positivo (Ayles *et al.* 2009).

A pesar de los problemas en la observación directa del bacilo de la tuberculosis, el objetivo contra la tuberculosis es detener e invertir su propagación para el 2015 y la estrategia por observación directa para reconocer la tuberculosis sigue siendo la columna vertebral para el control mundial de la tuberculosis (Ayles *et al.* 2009).

Es importante mencionar que la baciloscopía, puede discriminar MNT (micobacterias no tuberculosis) de la tuberculosis. Los cultivos de TB ofrecen muchos beneficios clínicos y pueden identificar la tuberculosis resistente a los medicamentos, facilitando así la identificación de estrategias óptimas terapéuticas en pacientes individuales más allá de los diagnósticos en tuberculosis. Diagnósticos oportunos de la tuberculosis, evitan muertes adicionales y el incremento de infecciones secundarias (Dowdy *et al.* 2008).

Si bien las iniciativas recientes han estimulado la búsqueda de una amplia variedad de enfoques para el diagnóstico de la tuberculosis activa y detección de resistencia a los medicamentos, los ensayos disponibles más prometedores hasta el momento son una adaptación de las técnicas de caldo de Cultivo (MOD). La sensibilidad a los medicamentos y la observación microscópica del ensayo (MOD), desarrollada en el Perú, combina caldo de cultivo en placas de 24 pocillos de cultivo de tejidos con la detección temprana de crecimiento, mediante un examen microscópico de los cultivos para detectar la formación de un cordón típico de *M. tuberculosis* (Ernst *et al.* 2007).

La combinación de estas técnicas puede mejorar el diagnóstico (Breen *et al.* 2007). A menudo, un resultado fiable no se alcanza con una sola técnica. Los métodos complejos y caros limitan la amplia gama de aplicaciones en los laboratorios a nivel mundial. Por tanto, es necesario preparar un nuevo protocolo para combinar técnicas que producen resultados precisos con un proceso simple y económico. Por ende, el objetivo de la presente investigación es identificar no micobacterias, micobacterias atípicas y *Mycobacterium tuberculosis* mediante un nuevo protocolo microbiológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas: las muestras utilizadas fueron ATP1084, TCD007 y LS identificadas como una no micobacteria alcohol ácido resistente, una micobacteria atípica y *M. tuberculosis*, respectivamente.

Frotis de tinción: ha sido desarrollado con los métodos de tinción de Ziehl-Neelsen y auramina. Las muestras de esputo fueron descontaminadas empleando el método con el hidróxido de sodio-N-acetil-L-cisteína. Tres alícuotas fueron utilizadas para el examen microscópico.

Cultivo Lowenstein-Jensen: después de la inoculación de 250 mL de la alícuota del descontaminante, se cultivaron en medio Lowenstein-Jensen a 37°C.

Cultivos MOD medio: el caldo se preparó en 2 placas de cultivo de tejidos (Becton Dickinson®) cada uno con 720 mL del descontaminante, caldo de Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), ácido oxálico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) (Becton Dickinson®) y polimixina, anfotericinaB, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina

(PANTA) (Becton Dickinson®). Para el control se examinaron diariamente durante 26 días con un microscopio de luz invertida con un aumento de 40X. Para reducir al mínimo la contaminación cruzada y la exposición ocupacional, las placas fueron selladas permanentemente dentro de bolsas de plástico ziploc® (Nantong Changrong Plash cs Co. Ltd. China) después de la inoculación y se examinaron posteriormente en la bolsa.

Cultivo en medio 7H11: el medio se preparó con las indicaciones disponibles en el inserto comercial. Las muestras se observaron durante 13 días.

RESULTADOS

Baciloscopía

El teñido con auramina registra ser más sensible que la tinción con Ziehl-Neelsen (ZN), siendo ambos procedimientos para bacterias alcohol ácido resistentes (Fig. 1 al 5). El teñido por ZN detectó cocobacillus para el código ATP1084 (Fig. 1), y la fig. 3 detectó una bacteria no alcohol ácido resistente por ZN. El código LS fue detectado positivo por auramina y ZN (Fig. 2 y 5), respectivamente. Adicionalmente, el código TCD007 se detectó positivo por ZN (Fig. 4).

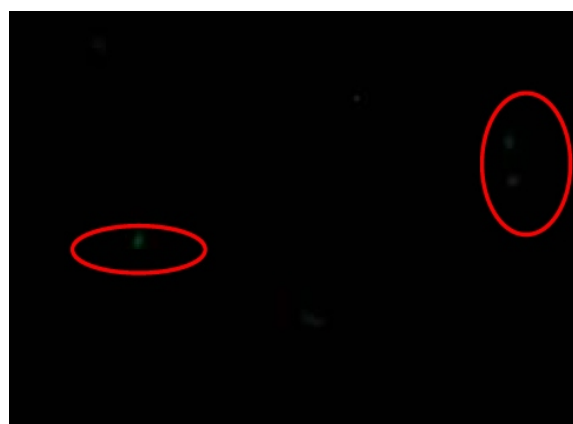


Figura 1. Teñido con Auramina de ATP 1084 con una magnificación de 400X (Muestra de esputo) visto en un microscopio de fluorescencia. Observe la forma de bacilos cortos.

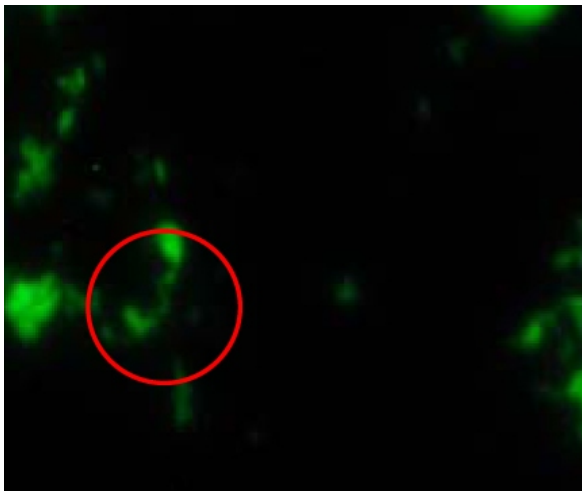


Figura 2. Teñido con Auramina de LS con una magnificación de 400X (muestra de cultivo sólido 7H11) visto en un microscopio de fluorescencia. Observe forma bacilar.

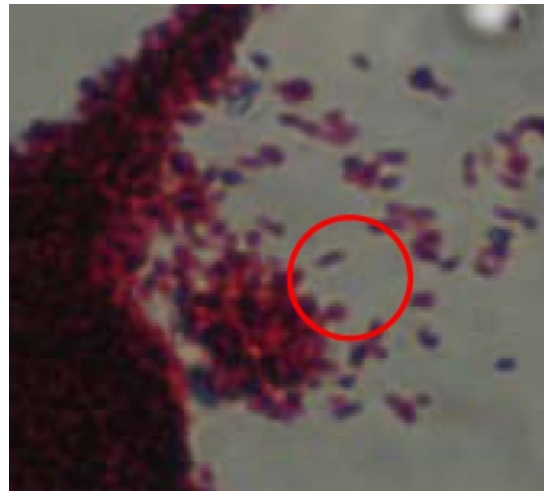


Figura 5. Teñido con Ziehl-Neelsen de LS con una magnificación de 400X (muestra de cultivo sólido 7H11). Observe la forma de bacilos cortos ácido alcohol resistentes.

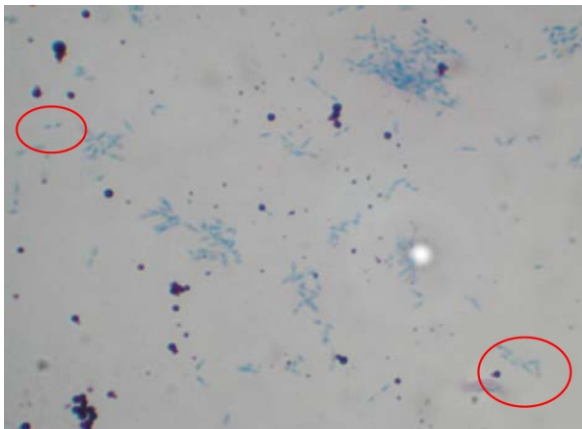


Figura 3. Teñido con Ziehl-Neelsen de ATP1084 con una magnificación de 400X (muestra de esputo). Observe la forma coccobacilar azules.

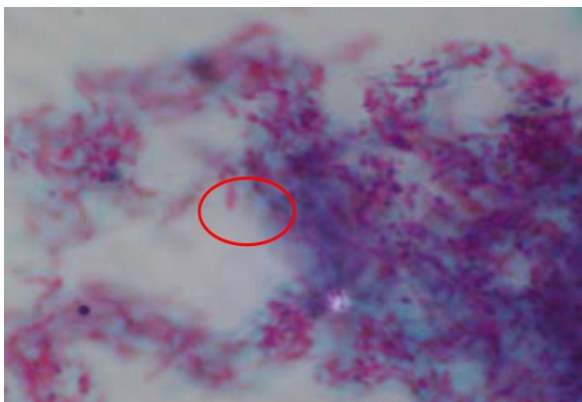


Figura 4. Teñido con Ziehl-Neelsen de TCD007 con una magnificación de 400X (Muestra de cultivo líquido MOD).

Cultivos

Los resultados del crecimiento de ATP1084, TCD007 y LS en los tres medios de cultivos son mostrados en las Figs. 6 al 17. En el medio LJ, la ATP1084 creció en 24 h (Fig. 6), en comparación a los 21 días de TCD007 (Fig. 8) y 31 días de LS (Fig. 9), respectivamente. La ATP1084 no mostró claramente las características de crecimiento de micobacterias (Fig. 7). La TCD007 se tiñó de color naranja y se mostró como una micobacteria atípica (Fig. 8). La ATP1084 mostró una similitud con un cultivo viejo de *M. tuberculosis* en medio MOD a los 3 días (Fig. 10). En la muestra TCD007 no se detectó la morfología típica de micobacterias con la formación de los cordones a los 26 días (Fig. 11). En las muestras de LS la formación de cordones típicos se mostró a los 13 y 16 días (Fig. 12 y 13). En el medio 7H11, ATP1084 mostró un crecimiento similar a micobacterias atípicas, con la formación de cordoncillos a las 7 y 24 h, respectivamente (Fig. 14 y 15). LS presentó la formación del cordón típico a los 13 días (Fig. 16). TCD007 mostró una forma atípica de crecimiento en la formación del cordón típico de micobacterias, porque las cuerdas estaban desorganizadas a los 9 días (Fig. 17).

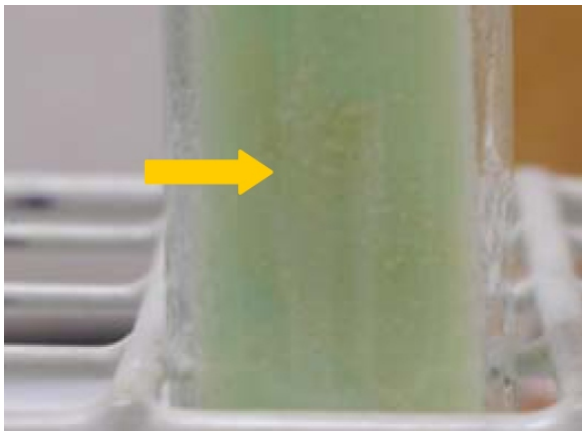


Figura 6. Cultivo Lowenstein-Jensen de ATP1084 crecido en 24 h (Muestra de esputo). Observe el crecimiento rápido y el aspecto brillante de las colonias.

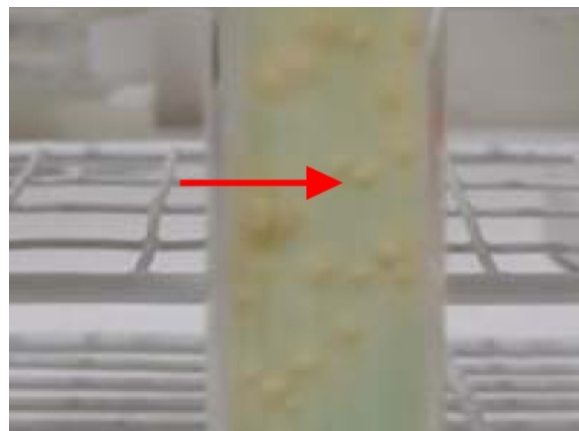


Figura 9. Cultivo Lowenstein-Jensen de LS crecido en 31 días (muestra de esputo). Observe las colonias secas y cremosas en forma de coliflor o migaja de pan.

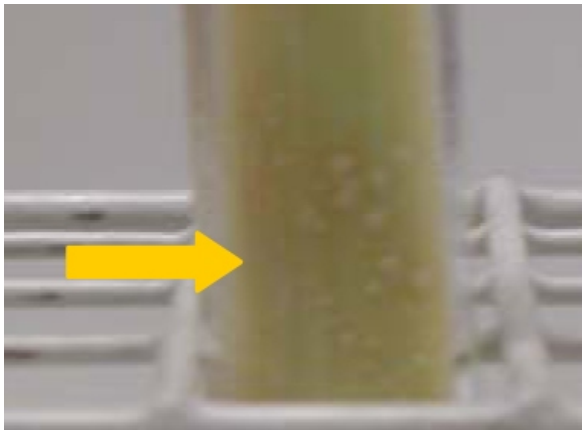


Figura 7. Cultivo Lowenstein-Jensen de ATP1084 crecido en 17 días (muestra de esputo). Observe el crecimiento rápido y el aspecto brillante de las colonias.



Figura 10. Cultivo líquido MOD de ATP1084 crecido en 3 días observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe el pequeño cordón señalado en la flecha y el crecimiento rápido (muestra de esputo).

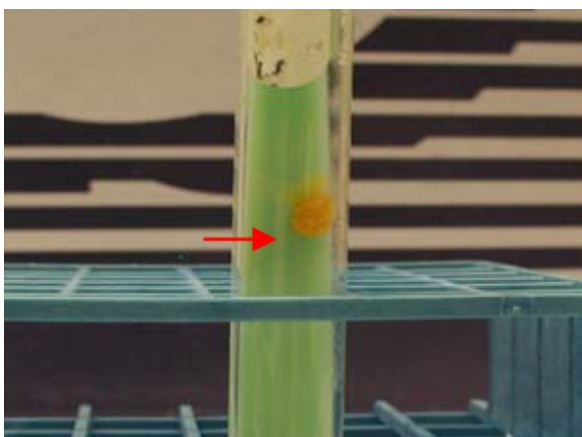


Figura 8. Cultivo Lowenstein-Jensen de TCD007 crecido en 21 días (Muestra de esputo canino). Observe el color naranja de las colonias y el crecimiento relativamente rápido.



Figura 11. Cultivo Líquido MOD de TCD007 crecido en 26 días y observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe el crecimiento atípico (grumoso) con un pequeño cordón que señala la flecha (muestra de esputo canino).

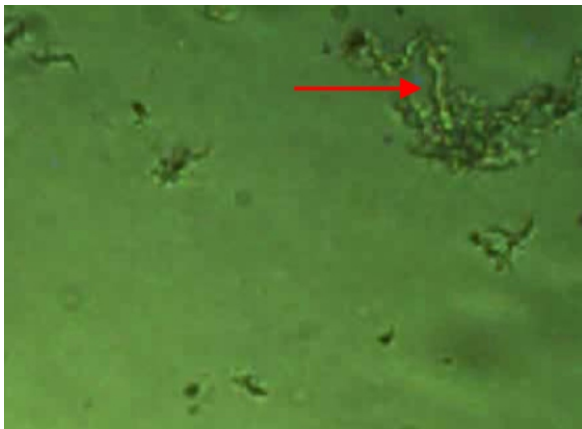


Figura 12. Cultivo Líquido MOD de LS crecido en 13 días y observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe el crecimiento rápido y los cordones (Muestra de esputo).

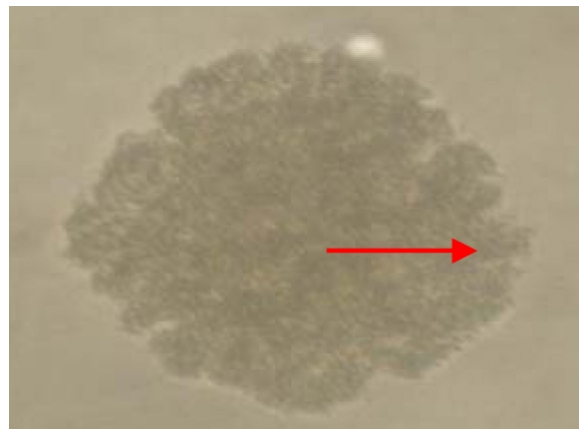


Figura 15. Cultivo en medio sólido 7H11 de ATP1084 crecido en 24 h y observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe el crecimiento rápido la forma circular densa y los finos cordones en la silueta de la colonia (muestra de medio líquido MOD).

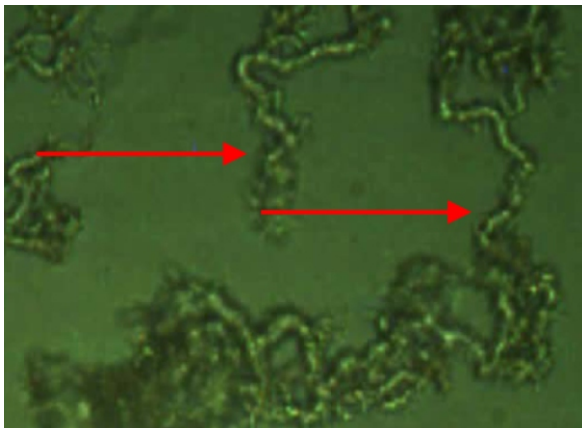


Figura 13. Cultivo líquido MOD de LS (*M. tuberculosis*) crecido en 16 días y observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe el crecimiento rápido y los cordones formados (muestra de esputo).

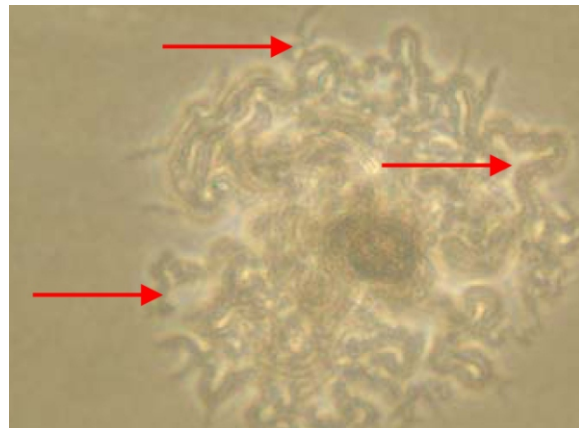


Figura 16. Cultivo en Medio Sólido 7H11 de LS crecido en 13 días y observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe como los cordones forman un crecimiento rápido y concéntrico típico (Muestra medio MOD).

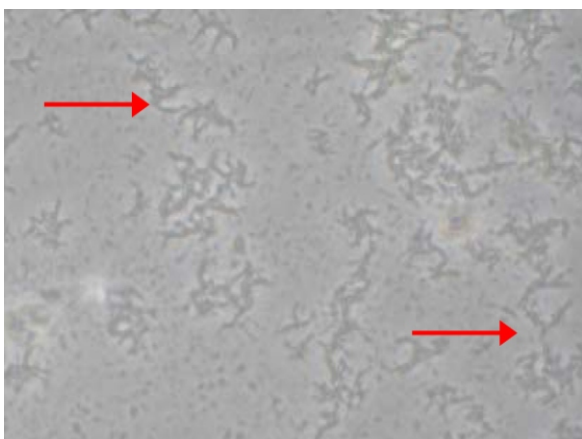


Figura 14. Cultivo en medio sólido 7H11 de ATP1084 crecido en 7 h y observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe el crecimiento rápido en h y los cordones (muestra de medio líquido MOD).

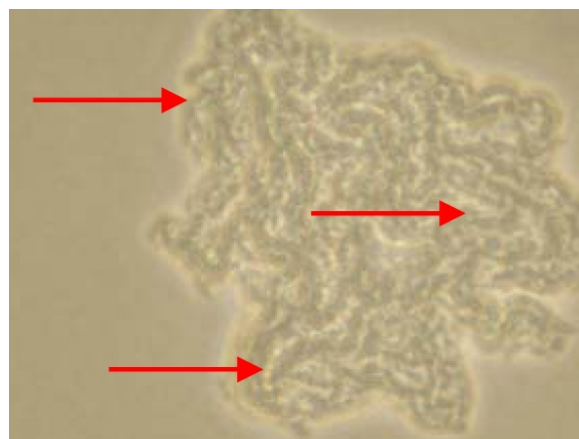


Figura 17. Cultivo en medio sólido 7H11 de TCD007 crecido en 9 días y observado en un microscopio de luz invertida a 40X. Observe el crecimiento rápido y desordenado de los cordones (Muestra canina).

DISCUSIÓN

La adecuada identificación de *M. tuberculosis* depende del presupuesto y del objetivo principal del laboratorio clínico. Las diversas técnicas utilizadas incluyen a las coloraciones de ZN y auramina; aunque la auramina es más sensible que ZN (Daley *et al.* 2009). El desarrollo de la técnica con auramina es más caro que el ZN, por lo tanto es recomendable sólo la tinción de ZN cuando el laboratorio no tiene la infraestructura suficiente, en especial para identificar los pacientes con alta carga bacteriana (Palomino *et al.* 2007). A pesar de que ZN es menos confiable, es necesario desarrollar esta técnica como primera opción por ser más barata y rápida, pues discrimina entre alcohol ácido resistentes y otras; sin embargo, es necesario comparar con la clínica del paciente. Por otro lado, se requiere diferenciar los positivos y los falsos negativos (Seok *et al.* 2008). A pesar de que la auramina es más sensible que el ZN, no es más específica que ZN. Una investigación ha mostrado que los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) al teñirse con auramina, y los positivos al ser confirmados con el teñido ZN, han demostrado similar especificidad (Breen *et al.* 2007).

El resultado de la identificación en caso de *M. tuberculosis* (LS) mostrado en el medio 7H11 fue mejor en comparación al LJ, debido que la detección de LS fue más clara en 13 días en el medio 7H11. A los 21 días recién LS se detectó en LJ. En el medio 7H11 con la muestra ATP1084 se detectó en 7 h y 24 h, respectivamente, observándose que el crecimiento fue atípico para las micobacterias. Además, el medio 7H11 fue más rentable en comparación al LJ. El medio 7H11 tiene un bajo grado de contaminación y la manipulación es más simple comparada al

LJ, aunque el medio 7H11 es más caro que el medio LJ. En otros tipos de micobacterias, la exactitud de la detección entre los medios 7H11 y LJ, puede variar como se muestra en *M. avium* cuando la detección del medio 7H11 medio fue similar en comparación con el medio LJ (Thoen *et al.* 1979). Por ende, los laboratorios deben utilizar el medio de cultivo adecuado y disponible, debido a que son más precisos para la identificación. Las muestras cultivadas en MOD son positivas en aproximadamente 7-9 días (Moore *et al.* 2006). El medio MOD se basa en el medio 7H9. Este medio es muy conveniente porque ahorra tiempo y promueve que las bacterias crezcan rápidamente. En algunas circunstancias, se pierden oportunidades para la quimioprofilaxis, por la falta de un medio preciso y rápido como el MOD. MOD es muy útil especialmente en los niños que necesitan una quimioprofilaxis pronta debido a que son más delicados a los antibióticos (Schaaf *et al.* 2007).

Es necesario seguir el siguiente protocolo microbiológico, con el fin de aclarar las muestras confusas. En primer lugar, desarrollar un frotis teñido con ZN, en caso de un resultado negativo de la muestra con tinción de ZN, la técnica de auramina debe emplearse. La muestra debe ser cultivada en los medios MOD, 7H11 y LJ, respectivamente, en el orden mencionado, si las técnicas de teñido no son bien interpretadas, Los medios MOD y 7H11 ayudarán a identificar con mayor rapidez y especificidad. Sin embargo, si existe una mala interpretación de los cultivos de estos medios, el resultado deberá ser confrontado con el cultivo LJ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayles, H.; Schaap, A.; Nota, A.; Sismanidis, C.; Tembwe, R.; Hass, P.; Mujoyeta, M.; Beyers, N. & Godfrey-Fausett P. 2009. Prevalence of Tuberculosis, HIV and respiratory symptoms in two Zambian communities: implications for tuberculosis control in the era of HIV. *PloS One*, 4(5):1-12.
- Breen, R.; Hardy, G.; Penin, F.; Lear, S.; Kinloch, S.; Smith, C.; Cropley, I.; Janossy, G. & Lipman, M. 2007. Rapid diagnosis of smear negative tuberculosis using immunology and microbiology with induced sputum in HIV-infected and uninfected individual. *PLoS One*, 2(12):1-6.
- Daley, P.; Michael, J.S.K.; Latha, A.; Mathai, D. & Pai J. 2009. A pilot study of short-duration sputum pretreatment procedures for optimizing smear microscopy for tuberculosis, *PLoS one*, 4:1-6.
- Djelouadji, Z.; Raoult, D.; Daffè, M. & Drancourt, M.A. 2008. Single –step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2(6):1-8.
- Dos Santos, R.; Scheid, K.; Willers, D. & Goldani, L. 2008. Comparative radiological features of disseminated disease due to *Mycobacterium tuberculosis* non-tuberculosis mycobacteria among AIDS patients in Brazil. *BMC Infection Diseases*, 8(24): 1-7.
- Dowdy, P.; Lourenco, M.; Cavalcante, S.; Sarauni, V.; King, B.; Golub, J., Bishai, D.; Durovni, B.; Chaisson, R. & Dorman, S. 2008. Impact and cost-effectiveness of culture for diagnosis of tuberculosis in HIV-Infected Brazilian adults. *PloS One*, 3(12):1-8.
- Ernst, J.; Trevejo-Nuñez, G. & Banaiee, N. 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of Tuberculosis. *The Journal of Clinical investigation*, 117: 1738-1745.
- Kashino, S.; Pollock, N.; Napolitano, D.; Rodrigues, V. & Campos-Neto, A. 2008. Identification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in urine of patients with active pulmonary tuberculosis: an innovative and alternative approach of antigen discovery of useful microbiol molecules. *Clinical and Experimental Immunology*, 153:56-62.
- Kremer, K.; Van Der Werf, J.; Au, B.; Anh, D.; Kam, K.; Rogier Van Doorn, R.; Borgdorff, M. & Soolingen, D. 2009. Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 335-339.
- Moore, D.; Carlton, A.; Gilman, R., Caviedes, L.; Coronel, J.; Vivar, A.; Sánchez, E.; Piñedo, Y.; Saravia, J.C.; Salazar, C.; Oberhelman, R.; Hollm-Delgado, M.G.; LaChira, D.; Escombe, A.R. & Friedland, J.S. 2006. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *The New England Journal of Medicine*, 355:1539-1550.

- Nerlich, A. & Losch, S. 2009.** Paleopathology of human tuberculosis and the potential role of climate. *Interdisciplinary Perspectives on Infections Diseases*, 10: 1-9.
- Palomino, J.C.; Cardoso, L.S. & Ritacco, V. 2007.** *Tuberculosis from Basic Science for patient care*. 687 p. en www.tuberculosis-textbook.com leído el 25 de noviembre del 2010.
- Schaaf, S.; Marais, B.; Whitelaw, A.; Hesselink, A.; Eley, B.; Hussey, G.D & Donald, P.R. 2007.** Culture-confirmed childhood tuberculosis in Cape Town, South Africa: a review of 596 cases. *BMC Infectious Diseases*, 7(140):1-8.
- Seok, J.; Eui-Chong, K.; Sei, J.; Sang-Min, L.; Chul-Gyu, Y.; Young-Soo, S. J. & Joon, Y. 2008.** The incidence and clinical implication of sputum with positive acid-fast bacilli smear but negative in mycobacterial culture in a tertiary referral Hospital in South Korea. *The Journal of Korean Medical Science*, 23: 767-771.
- Shiferaw, G.; Woldeamanuel, Y.; Gebeyehu, M.; Girmachew, F.; Demessie, D. & Lemma, E. 2007.** Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 1093-1097.
- Thoen, C.; Himes, E.; Jarnagin, J. & Harington, R. 1979.** Comparison of four culture media for isolation of *Mycobacterium avium* complex from porcine tissues, *Journal of Clinical Microbiology*, 9: 194-196.

Fecha de recepción: 27 de noviembre del 2010.

Fecha de aceptación: 25 de marzo del 2011.