

## Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración inhibitoria mínima de drogas antituberculosas frente a *Mycobacterium tuberculosis*

M. V. PONTINO<sup>1</sup>, B. DI GIULIO<sup>2</sup>, C. FERNÁNDEZ<sup>1</sup>, B. IMPERIALE<sup>1</sup>, A. BODON<sup>1</sup>, N. MORCILLO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Referencia del Programa de Control de la Tuberculosis de la Provincia de Buenos Aires, Hospital Dr. Antonio Cetrángolo, Italia 1750, (1602) Vicente López, Provincia de Buenos Aires; <sup>2</sup>Hospital Petrona V. De Cordero, San Fernando, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: nora\_morcillo@yahoo.com.ar

### RESUMEN

La tuberculosis multidrogorresistente (MDR), originada por aislamientos de cepas simultáneamente resistentes a isoniácida y rifampicina, es reconocida en la actualidad como un problema sanitario mundial. Nuevas técnicas que permitan detectar en forma temprana cepas MDR son necesarias para evitar su dispersión en la comunidad. En este trabajo hemos evaluado el empleo de un micrométodo colorimétrico para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de las drogas de primera línea frente a dichas cepas, usando el indicador: bromuro de 3-(4,5 dimetilthiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (M-MTT). Junto a la cepa de referencia H37Rv se procesaron 603 aislamientos clínicos, 507 provenientes de casos pulmonares (84,1%) y 96 de extrapulmonares (15,9%). Como estándar de referencia se utilizó el método de proporciones en medio de Löwenstein-Jensen (MP), con isoniácida (INH), 0,20 µg/ml; estreptomycin (SM), 4,00 µg/ml; etambutol (EMB), 2,00 µg/ml y rifampicina (RMP), 40,00 µg/ml. Los intervalos de concentraciones de las drogas empleadas en el M-MTT fueron: INH, 1,00-0,03 µg/ml; SM, 8,00-0,25 µg/ml; EMB, 32,00-1,00 µg/ml y RMP: 2,00-0,06 µg/ml. El resultado de la CIM por el M-MTT fue obtenido en un tiempo promedio de 8 días (rango total: 7 a 12 días). Los puntos de corte para cada una de las drogas, calculados mediante el análisis de la curva ROC, fueron: INH, 0,25 µg/ml; RMP, 0,50 µg/ml; SM, 4,00 µg/ml y EMB, 4,00 µg/ml. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron 100% en el caso de RMP; y 97,8% y 99,5%, respectivamente, para INH. El análisis estadístico de los resultados permitió concluir que el M-MTT es un método seguro para la rápida detección de MDR. Por su sencillez y bajo costo, podría ser aplicado en los países en vías de desarrollo.

**Palabras clave:** tuberculosis multidrogorresistente, drogas de primera línea, micrométodo colorimétrico, concentración inhibitoria mínima

### ABSTRACT

**Evaluation of a colorimetric micromethod for determining the minimal inhibitory concentration of antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*.** Multidrug-resistant tuberculosis (MDR) caused by strains resistant to both isoniazid and rifampin is now considered a serious sanitary problem worldwide. New technical tools for the early detection of these strains are urgently needed to avoid their spread within the community. We have evaluated a microplate colorimetric-based method to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of first-line antituberculosis drugs by using 3-(4, 5 dimethylthiazolyl 1-2 yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide as a bacterial growth indicator (MTT) (M-MTT). A total of 603 clinical isolates, 507 from respiratory cases (84.1%) and 96 from non-respiratory cases (15.9%) were processed. The proportion method on a Löwenstein-Jensen medium (PM) with isoniazid (INH), 0.20 µg/ml; streptomycin (SM), 4.00 µg/ml; ethambutol (EMB), 2.00 µg/ml and rifampin (RMP), 40.00 µg/ml, was used as the gold standard. The drugs and the concentration range tested were: INH, 1.00-0.03 µg/ml; SM, 8.00-0.25 µg/ml; EMB, 32.00-1.00 µg/ml and RMP, 2.00-0.06 µg/ml. MIC results were obtained on an average of 8 days (range: 7-12). The cut-off values for each drug, calculated by the ROC curve method, were: INH, 0.25 µg/ml, RMP, 0.50 µg/ml, SM, 4.00 µg/ml and EMB, 4.00 µg/ml. Sensitivity and specificity for RMP were 100 %, while for INH, they were 97.8% and 99.5% respectively. The results obtained suggested that M-MTT is a low cost and easy to set up method that could be applied to MDR clinical diagnosis in developing countries.

**Key words:** multidrug-resistant tuberculosis, first-line drugs, microplate colorimetric-based method, minimal inhibitory concentration

### INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) causada por aislamientos simultáneamente resistentes a isoniácida y rifampicina, o multidrogorresistente (MDR), plantea en la actualidad un serio

problema médico-sanitario mundial (14, 25, 34). El tratamiento requiere de una prolongada terapia con drogas alternativas, de mayor toxicidad y menor efectividad que las empleadas en el primer abordaje de la enfermedad, con resultados inciertos que incluyen la utilización de recursos quirúrgicos.

Cualquier demora en la detección de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* conducirá, inevitablemente, a un retraso en la iniciación de una terapia efectiva. La menor probabilidad de negativización bacteriológica y el mayor porcentaje de recaídas de los enfermos contribuiría a su diseminación en la comunidad, hecho que representa una amenaza para el control de la enfermedad (2).

Surge así la necesidad de desarrollar nuevas técnicas de laboratorio que permitan detectar en forma temprana el patrón de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *M. tuberculosis*. El método tradicionalmente utilizado en los laboratorios de los países en vías de desarrollo es el método de las proporciones (MP) empleando el medio sólido de Löwenstein-Jensen (LJ). Dada su alta reproducibilidad, validez y seguridad, este método es considerado como estándar de oro o método de referencia para pruebas de sensibilidad en tuberculosis. La desventaja que presenta es que los resultados están disponibles a los 42 días después de inoculada la muestra a partir de un primer aislamiento por cultivo (6, 11).

Existen otras técnicas más rápidas y de gran precisión, como por ejemplo el método radiométrico BACTEC 460 TB (BD Argentina) (26), que además de requerir reactivos de alto costo exige la manipulación de jeringas y agujas y de desechos radioactivos, lo que representa un riesgo para la bioseguridad de los operadores. Más recientemente han sido incorporados al mercado otros sistemas, como el BACTEC MGIT960 (BD Argentina), basado en la detección del consumo de oxígeno de los microorganismos en crecimiento por medio de la fluorescencia de un compuesto químico sensible a la iluminación ultra violeta (24), y el MB Bact (bioMérieux, Argentina), que a través de un sensor especial, sensible a los cambios de pH del medio, detecta el CO<sub>2</sub> liberado por el metabolismo bacteriano (5, 36).

La biología molecular resulta ser una importante herramienta para la detección rápida de resistencia, especialmente a la rifampicina. Esta droga actúa como marcador de MDR, ya que su resistencia está frecuentemente asociada a la resistencia a isoniácida (4). La prueba molecular difundida en el mercado (INNO-LIPA, RIF TB *Line probe assay*, Immunogenetic Ghent, Belgium), como así también la variante casera de *rifoligotyping*, tienen altos costos de equipamiento e insumos, y requieren un laboratorio de alta complejidad para ser realizadas (20, 27).

Otras técnicas que pueden ser utilizadas son: los ensayos de bioluminiscencia, en los que se detecta la viabilidad del *M. tuberculosis* por medio de la liberación de ATP en presencia o en ausencia de antibióticos (23); el E test, sistema comercial (AB Biodisk, Sweden) en el que se emplean tiras con concentraciones crecientes del antibiótico que se quiere evaluar, y el método que emplea bacteriófagos, capaces de infectar células viables de *M. tuberculosis*, donde se replican. Estas técnicas resultan muy atractivas, pero sus ventajas y desventajas para ser

aplicadas en países con recursos económicos limitados deberían ser consideradas (30, 32).

Ante esta situación, se ha planteado la necesidad de contar con pruebas de sensibilidad rápidas y no costosas, que aseguren resultados precisos y confiables. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) es un indicador que detecta crecimiento y viabilidad celular. El MTT es un reactivo de óxido-reducción que en condiciones de disminución de la concentración de oxígeno, como las generadas durante la actividad metabólica bacteriana, cambia de color: del amarillo (estado oxidado) al púrpura (estado reducido). Al reducirse, su solubilidad en medio acuoso disminuye y se produce la precipitación de cristales del reactivo. Las micobacterias sensibles a las drogas y las no viables no producirán el viraje del indicador. Esta técnica, por lo tanto, permite la lectura visual de la reacción, lo que facilita la determinación de la concentración de antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Su uso en pruebas de sensibilidad de micobacterias ha sido documentado previamente (1, 8, 10, 16, 21, 35).

Sobre la base de este conocimiento hemos implementado un micrométodo colorimétrico (M-MTT) en el que se utiliza este indicador para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de diferentes drogas antituberculosas frente a *M. tuberculosis* (7, 22, 28).

Los objetivos de este trabajo fueron: determinar el tiempo medio de obtención de resultados mediante el M-MTT; establecer los valores de corte de CIM para diferenciar entre los aislamientos sensibles y los resistentes a cada droga y relacionarlos con los resultados obtenidos por el MP; determinar la sensibilidad (S) y la especificidad (E) del M-MTT con relación al MP; y establecer la correlación entre los resultados de sensibilidad obtenidos por ambos métodos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamientos.** Un total de 603 aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de 507 casos pulmonares (84,1%) y de 96 casos extrapulmonares (15,9%), obtenidos de pacientes del conurbano bonaerense, fueron procesados junto a la cepa de referencia H37Rv ATCC 27294.

**Medios de cultivo.** Para la determinación de CIM se utilizó el medio líquido comercial de Middlebrook 7H9, suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC, BD Argentina) (M7H9). Para la realización del MP se preparó el medio de LJ, con agregado de antibióticos o sin ellos (6, 13).

**Antibióticos.** Las drogas isoniácida (INH), estreptomina (SM), etambutol (EMB) y rifampicina (RMP) fueron adquiridas a Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Se prepararon soluciones madres de 10,0 mg/ml, las que fueron esterilizadas por filtración, fraccionadas en tubos Eppendorf y conservadas a -20 °C hasta su utilización (período no mayor a tres meses). Las soluciones de trabajo para cada droga fueron preparadas en M7H9. Las concentraciones ensayadas en el M-MTT y el MP se encuentran detalladas en la Tabla 1.

**Preparación del indicador de crecimiento bacteriano MTT.** Se preparó una solución de MTT de 5,0 mg/ml en solución salina, se esterilizó por filtración y se conservó a 4 °C en oscuridad, por un máximo de 10 días.

**Tabla 1.** Concentraciones de drogas ensayadas por el M-MTT y por el método de las proporciones (MP)

Droga	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	M-MTT	MP
INH	1,00-0,50-0,25-0,13-0,06-0,03	0,20
SM	8,00-4,00-2,00-1,00-0,50-0,25	4,00
RMP	2,00-1,00-0,50-0,25-0,13-0,06	40,00
EMB	32,00-16,00-8,00-4,00-2,00-1,00	2,00

**Preparación de la solución solubilizante.** Se preparó una solución de Tween 80 al 20% en agua destilada, que se esterilizó por filtración y se conservó a temperatura ambiente. Posteriormente, se preparó una mezcla con 10,0  $\mu\text{l}$  de MTT y 12,0  $\mu\text{l}$  de solución solubilizante.

**Procedimientos.** Los especímenes clínicos fueron procesados e inoculados en LJ y MGIT para su posterior cultivo. El período de incubación total del LJ fue de 60 días, a 37 °C. El sistema MGIT960 fue usado para el aislamiento bacteriano, según el protocolo del fabricante (12).

Para la realización de la prueba de sensibilidad por el MP y la determinación de CIM por el M-MTT, el inóculo fue preparado a partir de un cultivo joven en LJ, disgregando los agrupamientos bacterianos en un tubo con perlas de vidrio que contenía unas gotas de agua destilada estéril. También se utilizaron cultivos en MGIT960 para la determinación de sensibilidad y CIM.

La suspensión bacteriana a partir de un cultivo en LJ fue preparada en medio M7H9 y homogeneizada en agitador vórtex por no más de 20 segundos. Posteriormente se dejó sedimentar y el sobrenadante fue ajustado a una turbidez comparable al estándar n° 1 de McFarland ( $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml). De esta suspensión se realizaron dos diluciones de trabajo: 1/25 y 1/2500. Cuando el cultivo de partida fue el MGIT 960, se prepararon también las dos diluciones de trabajo.

La determinación de CIM fue realizada en una placa estéril para cultivo de tejido de 96 pocillos (Falcon, BD Argentina), con fondo plano y tapa. Todos los pocillos del perímetro externo de la placa se llenaron con 0,2 ml de agua destilada estéril para evitar la evaporación, y los restantes con 0,1 ml de M7H9. En los pocillos de la primera hilera se colocó 0,1 ml de las soluciones de cada droga en M7H9, a una concentración cuatro veces superior a la mayor a ensayar. Para cada droga se realizaron *in situ* diluciones sucesivas al medio, hasta llegar a la última hilera de la placa. Una columna fue destinada al control de esterilidad del medio y controles de crecimiento. Uno de los pocillos de control de crecimiento fue reservado a la dilución 1/2500. Todos los pocillos restantes fueron inoculados con 0,1 ml de la dilución de trabajo 1/25. La incubación fue realizada durante 5 días a 37 °C y atmósfera normal. Luego de ese lapso, 22,0  $\mu\text{l}$  de la mezcla de MTT y Tween 80 fueron agregados a un pocillo de control de crecimiento. La placa fue incubada otras 24 h. Al cabo de ese tiempo se observó nuevamente. Al verificarse el crecimiento bacteriano, evidenciado por la aparición de un precipitado de formazán color violeta en ese pocillo, fueron revelados los restantes. La placa fue reincubada toda la noche para su posterior lectura. De no evidenciarse cambio de color en el primer control de crecimiento, se procedió a revelar otro pocillo de control de crecimiento, incubando otras 24 horas. El mismo proceso se repitió sucesivamente hasta comprobar el crecimiento bacteriano, manifestado por el cambio de color. La CIM para cada droga fue definida como la menor concentración que mostró un desarrollo de color menor al observado en la dilución 1/2500.

Como medida de bioseguridad, las placas fueron selladas con cinta de papel y envueltas en papel de aluminio. De este modo se evitaron, tanto posibles derrames como la acción de la

luz natural sobre el MTT. Dado que se trata de un compuesto fotosensible, este indicador puede reducirse inespecíficamente, lo que daría resultados falsos positivos.

**Procedimientos estadísticos.** El programa estadístico MedCal 7.0.2 (Mariakerke, Bélgica) fue usado para calcular el número y la proporción de aislamientos resistentes por cada método, los puntos de corte para cada droga, los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN), y el área bajo la curva ROC (AUC) (18, 29, 31).

## RESULTADOS

La Tabla 2 muestra los puntos de corte obtenidos para cada droga con el M-MTT, los porcentajes de aislamientos resistentes a cada droga por ambos métodos y el índice de correlación ( $r$ ) hallado. Como puede verse no se encontró diferencia significativa entre los porcentajes de aislamientos resistentes a cada droga detectados por ambos métodos. La diferencia entre la proporción de aislamientos sensibles y resistentes a cada droga evidenciados por el M-MTT y el MP fue analizada por la prueba de  $\chi^2$ .

Los coeficientes  $r$  mostraron una alta correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos para INH (0,98); SM (0,99) y RMP (0,99). Para EMB la correlación fue menor (0,74).

La Tabla 3 muestra los parámetros estadísticos calculados para cada una de las drogas ensayadas por el M-MTT sobre los aislamientos clínicos.

En la Figura 1 se encuentran detallados los puntos de corte para cada una de las drogas, calculados mediante el análisis de la curva ROC. Estos valores fueron: INH, 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ; RMP, 0,50  $\mu\text{g/ml}$ ; SM, 4,0  $\mu\text{g/ml}$  y EMB, 4,0  $\mu\text{g/ml}$ . El resultado de la CIM para M-MTT fue obtenido en un tiempo promedio de 8 días (mínimo: 7 días, máximo: 12 días). Para el MP, en cambio, el tiempo promedio fue de 28 días (mínimo: 28 días, máximo: 42 días).

La prueba M-MTT sobre la cepa H37Rv se realizó cada vez que un lote nuevo de placas con antibióticos era preparado, en un total de 76 determinaciones. Esto se hizo con el objetivo de verificar la actividad de los antibióticos en el sistema ensayado y evaluar la dispersión de la CIM y la variabilidad observada al aplicar este método en sucesivas determinaciones.

Con la cepa H37Rv los valores medios de las determinaciones de CIM y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%) fueron ( $\mu\text{g/ml}$ ): INH, 0,04 (0,03-0,06); SM, 1,08 (0,58-1,58); EMB, 2,32 (1,25-3,40). El valor medio para la RMP no pudo ser calculado ya que la mayoría de las determinaciones dieron valores de CIM < 0,06  $\mu\text{g/ml}$  (la menor concentración ensayada). Los valores de desviación estándar (DS) obtenidos fueron: INH, 0,02; RMP, 0,02; SM, 0,97 y EMB, 2,09. Con los aislamientos estudiados, la media de las determinaciones de CIM y los IC 95% obtenidos fueron ( $\mu\text{g/ml}$ ): INH, 0,04 (0,03-0,04); RMP, 0,06 (0,05-0,06); SM, 0,69 (0,54-0,68); EMB, 1,18 (1,06-1,30). Los DS obtenidos fueron: INH, 0,04; RMP, 0,04; SM, 0,6 y EMB, 1,05. Las unidades formadoras de

**Tabla 2.** Puntos de corte de cada droga con el M-MTT; número y porcentaje de aislamientos resistentes e índice de correlación (r) entre ambos métodos.

Droga	Aislamientos resistentes						
	Método				Diferencia entre porcentajes		
	MP		M-MTT		c <sup>2</sup>	P	r
Punto de corte (µg/ml)	n <sup>o</sup>	(%)	n <sup>o</sup>	(%)			
INH (0,25)	104	(17,2)	106	(17,6)	0,0011	0,9159	0,98
SM (4,00)	101	(16,7)	100	(16,6)	0,0290	0,8648	0,99
RMP (0,50)	71	(11,8)	70	(11,6)	0,0510	0,8219	0,99
EMB (4,00)	53	(8,8)	72	(12,0)	0,0780	0,7796	0,74

INH: isoniacida, SM: estreptomina, RMP: rifampicina, EMB: etambutol; r: índice de correlación; MP: método de proporciones; M-MTT: micrométodo colorimétrico con MTT

**Tabla 3.** Valores estadísticos para cada una de las drogas ensayadas sobre aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* por el M-MTT.

Valor estadístico	Droga			
	INH	RMP	EMB	SM
S (%)	97,80	100,00	87,50	77,00
E (%)	99,50	100,00	93,00	97,70
+LR	199,47	-	12,59	33,02
-LR	0,02	0,00	0,15	0,23
AUC	0,98	1,00	0,91	0,93
IC 95%	0,96-1,00	0,99-1,00	0,87-0,94	0,89-0,96

S: sensibilidad; E: especificidad; +LR: razón de probabilidad positiva; -LR: razón de probabilidad negativa; AUC: área bajo la curva; IC 95%: intervalo de confianza del 95%

colonias (UFC/ml) inoculadas en la placa fueron calculadas a partir del desarrollo bacteriano en los tubos empleados como controles de crecimiento del MP. En todos los casos se partió de suspensiones bacterianas con 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/ml.

La contaminación total o parcial, que imposibilitó la lectura y condujo a la repetición de la prueba, se produjo en 11 placas (1,8%).

## DISCUSIÓN

Cortar la cadena epidemiológica de transmisión de las cepas de *M. tuberculosis* resulta ser prioritario a la hora de evaluar estrategias de control de diseminación de la enfermedad, principalmente en los países en desarrollo, donde se registran también los más altos porcentajes de tuberculosis MDR.

Según Ellner, uno de los factores que ha contribuido a los pasados brotes de tuberculosis MDR ha sido la demora en obtener la confirmación de la enfermedad desde el laboratorio (9). Los laboratorios de diagnóstico y referencia deberían entonces contribuir con el empleo de técnicas que sean rápidas y seguras.

En este estudio hemos evaluado la aplicación de una técnica de microdilución colorimétrica, simple y económica, en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

El método de la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), aplicado a los resultados de CIM obtenidos para cada droga, fue relacionado con los valores hallados con el estándar de oro (MP). Este método permite calcular la S y la E a tantos puntos de corte como concentraciones sean ensayadas, y también permite determinar el antibiótico que muestra la mejor relación entre los valores de S y E. El valor del punto de corte calculado fue empleado posteriormente para calificar a un aislamiento como sensible o resistente a cada droga estudiada. Los altos valores de S y E hallados con el M-MTT para INH y RMP, como así también el alto nivel de correlación con los resultados obtenidos con el MP, sugieren que esta técnica podría ser empleada como prueba diagnóstica de resistencia a INH y RMP, las dos drogas más importantes en el tratamiento de la tuberculosis. La sensibilidad de detección de resistencia a EMB mediante el M-MTT (87,5%) ha mejorado con respecto a experiencias propias previas (datos no publicados), probablemente debido a que en esta evaluación del método la

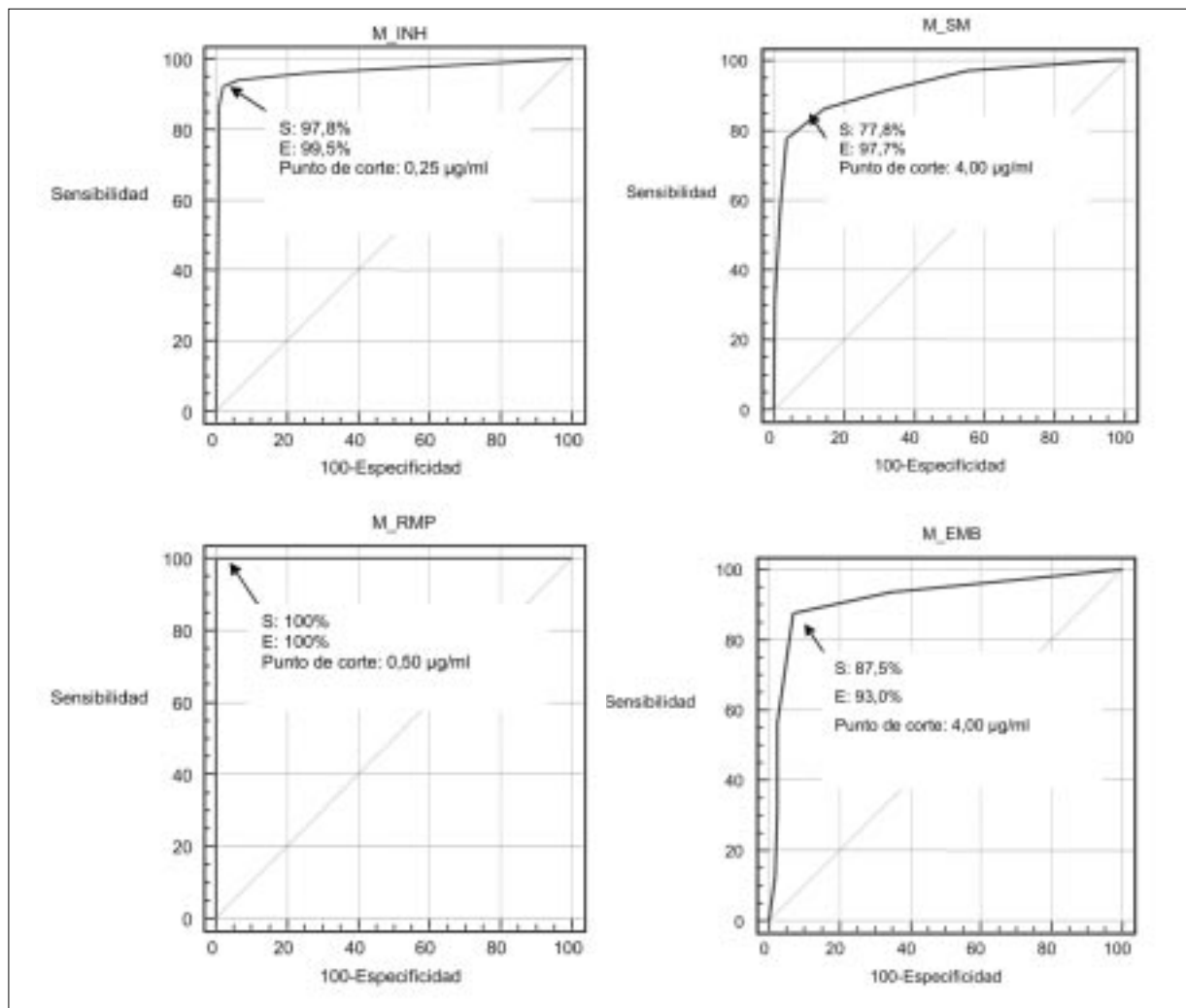


Figura 1. Curvas ROC para cada droga analizada por M-MTT

solución de la droga fue conservada entre 4 y 8 °C para su posterior utilización, a diferencia de lo publicado por otros autores (3, 17, 19). Con respecto a otros reportes, hemos obtenido para el EMB y la SM mejores valores de especificidad que de sensibilidad (17).

El análisis del AUC por el método de la curva ROC refleja el funcionamiento global de la prueba para cada droga en relación con su sensibilidad y su especificidad; este valor se considera muy satisfactorio cuando se aproxima a 1. Además, el índice de correlación entre los porcentajes de aislamientos resistentes hallados con el MP y el M-MTT resultó ser muy alto, especialmente para INH, RMP y SM.

El cálculo de la relación de probabilidades (LR), como una estimación de los valores predictivos de la prueba cuando no se conoce la prevalencia exacta de la resistencia en la comunidad, demostró que el M-MTT tuvo valores altos para la predicción de resultados correctos, tanto positivos como negativos, a excepción de los resultados positivos por M-MTT para EMB.

A la gran ventaja que representa la posibilidad de obtener resultados de resistencia a INH y RMP en alrededor de una semana, se opone el hecho de que la prueba se realiza en medio líquido, con mayor manipulación que en el caso de las placas, lo que puede generar aerosoles y comprometer la bioseguridad del operador. Por este motivo, los laboratorios que realicen estas determinaciones deberán extremar las medidas de bioseguridad y deberán contar con experiencia suficiente en la realización de pruebas de sensibilidad por los métodos convencionales. Asimismo, deberían extremarse las precauciones para evitar la posibilidad de que se produzcan contaminaciones cruzadas al inocular las dos mitades de las placas con dos cepas distintas, hecho que no ha sido observado durante el presente estudio.

El análisis estadístico aplicado a los resultados permitió concluir que el M-MTT es un método confiable y de alta reproducibilidad, debido especialmente a la escasa dispersión observada en los valores de CIM sobre la cepa de referencia H37Rv para INH y RMP. El M-MTT resultó

en este trabajo un método alternativo y eficaz en la rápida detección de MDR, que podría ser implementado en los laboratorios de análisis clínicos de mediana complejidad que cuenten con elementos de protección y seguridad para el operador: cabina de bioseguridad de flujo laminar vertical (nivel II o III de bioseguridad) (15, 33). Por ser un método rápido, sencillo y económico, ya que el costo de la determinación de la CIM para cada droga fue estimado en U\$S 0,83, resultaría especialmente aplicable y de utilidad en los países en vías de desarrollo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abate G, Aseffa A, Selassie A, Goshu S, Fekade B, Wolde Meskal D, et al. Direct colorimetric assay for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2004; 42: 871-3.
- Ashok R, Awdhesh K, Nishat A. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. Emerg Infect Dis National Center for Infectious Diseases. Centers for Disease Control and Prevention, 1998, Atlanta, USA.
- Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 796-800.
- Barrera L. La tuberculosis vista con el lente de aproximación de la Biología Molecular. Medicina 2000; 60: 17-25.
- Brunello F, Favari F, Fontana R. Comparison of MB/Bact T and BACTEC 460 TB systems for recovery of *Mycobacteria* from various clinical specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 1206-9.
- Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menan NK, Mitchinson DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. Bull World Health Organization 1969; 41: 21-43.
- Collins LA, Franzblau SG. Micro plate alamar blue assay versus Bactec460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium*. Int J Tuberc Lung Dis 1997; 41: 1004-9.
- De Logu A, Uda P, Pellerano ML. Comparison of two rapid colorimetric methods for determining resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, isoniazid and streptomycin in liquid medium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 33-9.
- Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, Fishl MA, Sepkowitz KA, Golberger MJ, et al. Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. J Infect Dis 1993; 168: 537-51.
- Foongladda S, Roengsanthia D, Arjattanakool W, Chuchottaworn C, Chairprasert A, Franzblau SG, et al. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6: 1118-22.
- Goods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. Clin Infect Dis 2000; 29: 1209-15.
- Hanna B, Ebrahimzadeh A, Elliott B, Morgan M, Novak S, Rush-Gerdes S, et al. Multicenter evaluation of the Bactec MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1999; 37: 748-52.
- Heifets LB. Conventional methods for antimicrobial susceptibility testing of *M. tuberculosis*. En: Bastian I, Portaels F, editors. Multidrug-resistant tuberculosis. London, Kluwer Academic Publishers, 2001, p. 135-6.
- Herrera D, Cano R, Godoy P, Peiro EF, Castell J, Ibáñez C, et al. Multidrug-resistant tuberculosis outbreak on an HIV-ward - Madrid, Spain, 1991-1995. Morb Mortal Wkly Rep 1996; 45: 330-3.
- Ken PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III Laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control. Atlanta, USA, 1985,
- Lemus D, Martín A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 130-3.
- Martin A, Morcillo N, Lemus D, Montoro E, Da Silva Telles MA, Simboli N, et al. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. Int J Tuberc Lung Dis 2005; 9: 901-6.
- McNeil BJ, Hanley JA. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves. Med Decis Making 1984; 4: 137-50.
- Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martín A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of nitrate reduction assay, the MTT test and resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 500-5.
- Morcillo N, Zumárraga M, Alito A, Dolmann A, Schouls L, Cataldi A. A low cost, home-made, reverse-line blot hybridisation assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2002; 6: 959-65.
- Morcillo N, Di Giulio B, Testani B, Pontino M, Chirico C, Dolmann A. A microplate indicator based method for determining the multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. Int Tuberc Lung Dis 2004; 8: 253-9.
- Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miorner H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998; 36: 1214-9.
- Palomino JC. Novel rapid antimicrobial susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis*. En: Bastian I, Portaels F, editors. Multidrug-resistant tuberculosis. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 152-4.
- Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Inter J Tuberc Lung Dis 1999; 3: 344-8.
- Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, Dambrosi A, et al. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. J Clin Infect Dis 1997; 176: 167-72.
- Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, Mc Clatchy JK, et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol 1988; 15: 689-96.
- Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LIPA Rif TB assays a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2093-8.
- Thom SM, Horobin RW, Seidler E, Barrer MR. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. J Appl Bacteriol 1993; 74: 433-43.
- Toman K. Sensitivity, specificity and predictive values of diagnostic tests. Bull Int Union Tuberc 1981; 56: 18-30.
- United Nations University (UNV) and Latin American and the Caribbean Network of tuberculosis (REACTB). New technologies for diagnosis and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* for developing countries. Institute of National Laboratories of Health (INLASA). La Paz, Bolivia, 1998, p.24-32.
- Van Der Schouw IT, Verbeek AIM, Ruijs SHJ. Guidelines

- for the assessment of new diagnostic tests. *Investigative Radiology* 1995; 30: 334-40.
32. Wilson SM, Suwiadi ZA, Mc Nerney R, Porter J, Drobniewski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 1997; 4: 465-8.
  33. World Health Organization. The containment laboratory biosafety level III. Laboratory biosafety manual, Second edition. Geneva, Switzerland, 1993, p. 19-23.
  34. World Health Organization. Antituberculosis drug resistance in the world. Report N° 2. Prevalence and Trends. (WHO/CDC/ TB/00 .278) 2000, Geneva.
  35. Yajko D, Madej J, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, *et al.* Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2324-7.
  36. Badak FZ, Goksel S, Sertoz R, Nafie B, Ermertcan S, Cavusoglu C, *et al.* Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1602-5.

Recibido: 19/9/05 – Aceptado: 14/8/06