

Artigo Original

Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina*

Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains

MARTA OSÓRIO RIBEIRO, MARLEI DA SILVA GOMES, SIMONE GONÇALVES SENNA,
MARIA LUCIA ROSA ROSSETTI, LEILA DE SOUZA FONSECA.

Introdução: As taxas de resistência aos fármacos constituem um dos pilares da avaliação dos programas de controle da tuberculose. A demora na obtenção dos resultados, consequência da metodologia convencional utilizada, faz com que haja a necessidade de avaliação de novos testes, mais rápidos e menos onerosos.

Objetivo: Comparar técnicas fenotípicas rápidas para determinação do perfil de susceptibilidade de *M. tuberculosis*, utilizando indicadores de viabilidade celular, com o teste das proporções em Löwenstein-Jensen, padrão-ouro.

Método: Foram utilizadas 166 cepas de *M. tuberculosis* com o perfil de susceptibilidade conhecido. A concentração mínima inibitória de cada fármaco foi determinada, em microplaca, utilizando-se meio líquido e os indicadores de oxi-redução, Alamar Blue® e brometo de tetrazolium. O ponto de corte entre a cepa sensível e a resistente foi estabelecido como concentração mínima inibitória maior ou igual a 0,2 µg/mL para isoniazida e 1,0 µg/mL para rifampicina.

Resultados: Houve concordância total entre os dois métodos de determinação da concentração mínima inibitória. Comparando os resultados dos testes com o padrão-ouro, obteve-se uma concordância de 95%, para isoniazida e rifampicina. O tempo para obtenção dos resultados foi de 7 dias, contrastando com os 28 dias pelo método convencional.

Conclusão: Os testes para determinação da concentração mínima inibitória, em meio líquido, utilizando indicadores de oxi-redução, são rápidos e podem ser utilizados como alternativa rápida na determinação de susceptibilidade de cepas de *M. tuberculosis*.

J Bras Pneumol 2004; 30(4) 455-60

Descritores: Tuberculose. Teste de susceptibilidade. Indicadores de oxi-redução. Concentração mínima inibitória

Background: Knowledge of the rates of drug resistance is one of the pillars of tuberculosis control program evaluation. Data from low-resource countries are scarce and results are delayed due to the techniques employed. There is therefore an urgent need for evaluation of faster and less onerous testing methods.

Objective: To compare the performance of rapid colorimetric assays for phenotyping that employ oxidation-reduction indicators to determine the susceptibility profile of *Mycobacterium tuberculosis* with the gold-standard proportion method on Lowenstein-Jensen Medium.

Method: We analyzed 166 *M. tuberculosis* strains of known susceptibility. Minimal inhibition concentrations for isoniazid and rifampicin were determined in microplates, using a liquid medium and Alamar Blue and tetrazolium bromide indicators. To measure agreement the Kappa value was used. Cutoff values between sensitive and resistant strains were defined as 0.2µg/mL and 1.0µg/mL for isoniazid and rifampicin, respectively.

Results: There was 100% concordance between Alamar Blue and tetrazolium bromide methods in the determination of minimal inhibition concentrations. Agreement between the colorimetric method and the Lowenstein-Jensen was 95% for isoniazid and rifampicin. Using the colorimetric method, results were obtained within 7 days, in contrast to the 28 days required for the conventional method.

Conclusions: Assays to determine minimal inhibition concentrations in liquid medium and employing oxidation-reduction indicators proved to be rapid and inexpensive. This method has the potential to become a faster, alternative method for determining susceptibility of *M. tuberculosis* strains in developing countries.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*. Disease susceptibility. Isoniazid/therapeutic use. Rifampin/therapeutic use.

*Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Endereço para correspondência: Marta Osório Ribeiro. Av. Ipiranga, 5400, Bairro Jardim Botânico
CEP: 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: 55 51 3288 4034. Email: martaoso@terra.com.br
Apoio financeiro: Rede Brasileira de Pesquisa em TB (REDE-TB)/Processo 62.0055/01-4-PACDT-Milenio.
Recebido para publicação, em 24/3/04. Aprovado, após revisão, em 28/5/4.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), conhecida a milhares de anos, continua sendo um relevante problema de saúde pública⁽¹⁾. Até a década de 1.980, tinha-se a expectativa da eliminação dessa enfermidade, contudo, o crescimento mundial da sua incidência levou, em 1.993, a Organização Mundial de Saúde a declarar a tuberculose como em estado de emergência, alertando para a necessidade de maiores esforços no seu combate⁽²⁾. Apesar dos procedimentos para seu controle e dos regimes terapêuticos usados estarem bem estabelecidos, existem dificuldades que são inerentes à doença, sendo uma das principais o surgimento de cepas resistentes aos fármacos^(3,4).

Os estudos epidemiológicos de resistência aos fármacos anti-TB fornecem indicadores, como a prevalência da resistência primária e adquirida, os quais são úteis na avaliação da qualidade do tratamento e do programa de controle da TB. Para esses estudos, a metodologia clássica recomendada (padrão-ouro) é o método das proporções, realizado em meio sólido ou os sistemas automatizados (MB/BacT e BACTEC 960) e semi-automatizados (BACTEC 460). Essas metodologias ou têm custo elevado ou são de difícil execução na rotina do laboratório. Isto faz com que existam poucas informações disponíveis a respeito da transmissão e do padrão de resistência, tanto da primária como da adquirida⁽⁵⁾. Neste trabalho buscou-se comparar o perfil de susceptibilidade de cepas de *M. tuberculosis* à isoniazida (INH) e rifampicina (RMP), através de uma nova metodologia que utiliza indicadores de viabilidade celular, para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) para a INH e RMP.

MÉTODO

Foram utilizadas 166 cepas de *M. tuberculosis* provenientes de coleções dos seguintes laboratórios: Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul; Hospital Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro; Centro de Referência Professor Hélio Fraga, do Rio de Janeiro; e Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo. Foram também utilizadas cepas padrão, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, e como padrão de resistência tanto à INH quanto à RMP foi utilizada *M. fortuitum* ATCC 6841, ambas fornecidas pelo Centro de Referência Professor Hélio Fraga.

Síglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho:

TB	- Tuberculose
INH	- Isoniazida
RMP	- Rifampicina
MPLJ	- Método das proporções em Löweinstein-Jensen
LJ	- Löweinstein-Jensen
CMI	- Concentração mínima inibitória
MTT	- [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide]
MAB	- Método Alamar Blue
MMTT	- Método MTT
SM	- Estreptomina
EMB	- Etambutol

Todas as cepas foram identificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* através de métodos fenotípicos clássicos. O teste de susceptibilidade pelo método das proporções em Löwenstein-Jensen (MPLJ) foi realizado segundo o Manual de Bacteriologia da Tuberculose⁽⁶⁾. A partir do crescimento do *M. tuberculosis* em meio de Löwenstein-Jensen (LJ), foram preparadas suspensões com turvação equivalente ao tubo 3 da Escala McFarland, em tampão fosfato pH 7,0 e transferidas para criotubos de 2 mL, onde foram guardadas a - 20 °C.

Os métodos para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foram realizados adaptando-se as técnicas propostas por vários autores⁽⁷⁻⁹⁾. O teste foi realizado em microplacas de 96 orifícios, de fundo plano, com tampa estéril (Costar, Corning). Foi utilizado o meio Middlebrook 7H9 Broth (Difco), contendo glicerol e enriquecido com OADC a 10% e Bacto Casitone (Difco). Os fármacos INH e RMP (Sigma) foram preparados como solução estoque na concentração de 10.000 µg/mL, em água destilada estéril e etilenoglicol (Difco) respectivamente. As concentrações dos fármacos INH e RMP foram escolhidas baseadas nos pontos de corte (*cut off*), padronizadas para o Sistema BACTEC 460 TB: 0,2 µg/mL para a INH e 1,0 µg/mL para a RMP⁽¹⁰⁾. Após as diluições seriadas, as concentrações finais na microplaca para a INH foram de 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 µg/mL. Para a RMP as concentrações finais foram de 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,062 µg/mL⁽⁹⁾. A suspensão do *M. tuberculosis* foi preparada a partir do crescimento em meio sólido de até 30 dias, em tubos contendo pérolas de vidro e água destilada estéril. Após agitação e conseqüente repouso, a suspensão foi gotejada em outro tubo com água destilada estéril, até obtenção de

turvação comparável ao tubo N° 1 da Escala McFarland. Para utilização na microplaca, o inóculo foi diluído a 1:25 em meio Middlebrook 7H9.

A solução de uso dos indicadores foi preparada no dia do teste. A partir do produto original Alamar Blue® (Fisher Scientifics), foi feita uma mistura com uma solução de Tween 80 a 10% (Interlab) em água, na proporção volume a volume⁽⁷⁾. Na microplaca foi usado volume de 25 µL em cada orifício. O Alamar Blue® é um indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade redox. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Para a solução de uso, o MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl-tetrazolium bromide] (Sigma) foi diluído em etanol absoluto a 1 mg/mL e adicionado de quantidades equivalentes (v/v) a de uma solução de Tween 80 a 10%. MTT é um sal de tetrazolium que é reduzido por enzimas desidrogenases, formando cristais de formazana solúveis em etanol. O volume de uso nos orifícios da microplaca foi de 50 µL. A forma oxidada é amarela e a forma reduzida é de cor púrpura.

Para cada bateria de testes foram testadas as cepas padrão. Os orifícios da periferia da microplaca foram preenchidos com 200 µL de água destilada estéril, para evitar a evaporação do meio na estufa. Foram incluídos orifícios para controle dos fármacos e do meio de cultura. Com exceção dos orifícios da periferia, os demais receberam 100 µL de meio líquido 7H9. Nos orifícios iniciais de cada linha, foram adicionados 100 µL de cada fármaco. A partir desses orifícios e com o auxílio de pipeta multicanal, foram feitas diluições seriadas. Na última coluna não foram adicionados os fármacos, para que ficasse como controle do crescimento da bactéria. Dessa maneira todos os orifícios ficaram com 100 µL de volume. Foi então adicionado 100 µL da suspensão de cada cepa e o volume final foi, portanto, de 200 µL.

Cada microplaca foi selada com filme plástico e permaneceu incubada na estufa a 37 °C por cinco dias. No quinto dia foram adicionados os respectivos indicadores nos orifícios de controle das bactérias, e nos orifícios de controle dos fármacos e do meio. No dia seguinte, havendo viragem dos indicadores nos orifícios controle do crescimento bacteriano, foi adicionado indicador em todos os orifícios restantes. As microplacas

foram novamente levadas à estufa por 24 horas. A CMI foi então determinada e definida como a menor concentração do fármaco capaz de impedir a mudança de cor, ou seja, de inibir o crescimento celular.

RESULTADOS

Através do MPLJ foi determinado o perfil de susceptibilidade à INH e RMP. Dentre as 166 cepas estudadas, 34 foram sensíveis e 91 foram resistentes a ambos os fármacos. Três cepas foram resistentes apenas à RMP e 38 foram resistentes apenas à INH. Assim, considerando cada fármaco separadamente, para a INH foram 129 cepas resistentes e 37 sensíveis. Para a RMP foram 94 cepas resistentes e 72 sensíveis.

As 166 cepas de *M. tuberculosis* foram testadas pelo método Alamar Blue® (MAB) e MTT (MMTT), para determinação da CMI. As 37 cepas sensíveis à INH (MPLJ) apresentaram as mesmas CMIs, tanto para o MAB como para o MMTT. Das 129 cepas resistentes (MPLJ), 23 apresentaram divergências em apenas uma diluição entre as CMIs obtidas pelo MAB e pelo MMTT, porém considerando-se o ponto de corte entre sensíveis e resistentes de 0,2 µg/mL não houve discordância entre os dois métodos. As 72 cepas sensíveis à RMP apresentaram as mesmas CMIs, tanto para o MAB como para o MMTT. Dos 94 cepas resistentes, 5 divergiram em somente uma diluição entre as CMIs obtidas pelo MAB e pelo MMTT, mas, de maneira análoga aos resultados para a INH, não houve discordância na classificação sensível/resistente considerando-se o ponto de corte de 1,0 µg/mL. Os métodos estudados para a determinação da CMI (MAB e MMTT) mostraram concordância entre si, quando se aplicaram os pontos de corte de 0,2 µg/mL para a INH e 1,0 µg/mL para a RMP.

Avaliamos a força de concordância entre os dois métodos e o MPLJ, calculando o índice kappa. Para a INH, o valor do indicador kappa foi $\kappa = 0,89$ e para a RMP, $\kappa = 0,95$, o que permite dizer que a força de concordância foi quase perfeita para os dois métodos, para os dois fármacos. A Tabela 1 apresenta a comparação entre os resultados do MAB e do MMTT com os do MPLJ. Para a INH, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 95,3 % e 97,3 %, respectivamente. Para a RMP, sensibilidade e especificidade foram de 91,5 % e 100 %, respectivamente.

TABELA 1
 Comparação entre os resultados do método Alamar Blue (MAB) e método MTT (MMTT)
 e o método das proporções em 166 cepas de *M. tuberculosis*

MAB e MMTT($\mu\text{g/mL}$)	Método das Proporções			
	Isoniazida		Rifampicina	
	Resistente	Sensível	Resistente	Sensível
Resistentes à INH ($\geq 0,2$)	123 (96%)	1 (2,6%)	-	-
Sensíveis à INH ($< 0,2$)	6 (4%)	36 (97,4%)	-	-
Resistentes à RMP ($\geq 1,0$)	-	-	86 (93,5%)	-
Sensíveis à RMP ($< 1,0$)	-	-	8 (8,7%)	72 (100%)
TOTAL	129 (100%)	37 (100%)	94 (100%)	72 (100%)

INH: isoniazida; RMP: rifampicina.

DISCUSSÃO

A importância de se testar novas metodologias fenotípicas para detectar susceptibilidade aos fármacos anti-TB, principalmente INH e RMP, que sejam práticas e efetivas e que permitam um resultado mais rápido do que o fornecido pelo método convencional, reflete a preocupação com o controle da emergência e da transmissão de cepas resistentes. Assim, métodos fenotípicos rápidos, confiáveis e de simples execução, também vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de diminuir o tempo de resposta e o custo dos testes. Os testes de susceptibilidade realizados em microplacas representam uma dessas alternativas. A utilização de indicadores, como os sais de resazurina e os de tetrazolium, para detectar viabilidade celular, é uma alternativa para melhor visualização da leitura desses testes em microplacas. Esses compostos funcionam como substratos cromogênicos de enzimas desidrogenases, agem como indicadores de oxidação-redução, e são reduzidos (pelo ganho de hidrogênio) por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o sistema de transporte durante o metabolismo celular⁽¹¹⁾.

Desde 1.995 estudos vêm sendo realizados com a utilização do Alamar Blue® (sal de resazurina) como indicador de crescimento celular⁽¹²⁾. Os autores denominaram o método MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*) e compararam esse método ao das proporções em ágar, obtendo uma concordância de 97% para determinar a CMI de cepas de *M. tuberculosis*. Outros estudos aplicando modificações na leitura do teste, utilizando fluorescência, também mostraram bons resultados^(13,14). Uma concordância de 93,6% foi

encontrada quando comparado com o sistema BACTEC 460⁽⁷⁾ e 97,1% quando comparado com o método das proporções em meio sólido, e os resultados ficaram disponíveis num período de 8 a 10 dias⁽⁸⁾.

O corante tetrazolium (MTT) foi usado como indicador de crescimento celular na determinação da CMI para o complexo *M. avium*⁽¹⁵⁾. A detecção de resistência à RMP em cepas de *M. tuberculosis* e a padronização da metodologia em microplacas foi estabelecida em 1.998, quando os autores estabeleceram o valor do ponto de corte para definir resistência e sensibilidade à RMP⁽¹⁶⁾. A padronização desta metodologia em tubos foi realizada através da comparação com o sistema BACTEC 460, para detectar resistência à RMP, com resultados concordantes⁽¹⁷⁾.

Neste trabalho foram utilizadas 166 cepas de *M. tuberculosis* com o objetivo de se analisar as performances de novas metodologias de determinação da CMI, as quais, quando comparadas com o método padrão convencional em meio sólido, foram avaliadas quanto à sensibilidade e concordância. Para avaliar a força de concordância entre os novos métodos e o convencional, determinamos previamente os pontos de corte, sendo de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ para a INH e de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para a RMP. Assim, os novos métodos mostraram concordância entre si de 100%. Quando comparamos os métodos MAB e MMTT com o MPLJ, observou-se uma concordância de 95% para os dois fármacos. Para a INH, a sensibilidade e a especificidade foram 95,3% e 97,3%, respectivamente. Para a RMP, a sensibilidade e a especificidade foram de 91,5% e 100%, respectivamente.

Em dois trabalhos publicados^(18,9), os pontos de corte, para esses dois fármacos, foram estabelecidos após análise da performance do estudo. No primeiro trabalho, foram avaliadas 80 cepas de *M. tuberculosis*, e o método de determinação da CMI foi o REMA (*Resazurin Microtiter Assay Plate*), que utiliza resazurina como indicador de viabilidade celular e o método padrão-ouro foi o MPLJ. Para a INH, a sensibilidade e especificidade foram de 96,2% e 100%, respectivamente. Para a RMP, todos os 80 resultados foram concordantes (100%). No segundo trabalho, os autores compararam os métodos MABA (Alamar Blue®) e TEMA (*Tetrazolium Microplate Assay*) (MTT), para a determinação da CMI de 35 cepas de *M. tuberculosis* para INH, RMP, estreptomicina (SM) e etambutol (EMB). Houve forte concordância entre os métodos. Não ficou claro, no artigo, qual o padrão-ouro ao qual foi comparado ou se foi apenas uma comparação entre os novos métodos.

Em testes que determinam a CMI realizados em meio líquido, variáveis técnicas e biológicas dificultam a sua reprodutibilidade, tais como: tamanho do inóculo, fase de crescimento da bactéria, características do meio e estabilidade do fármaco⁽¹⁹⁾. Neste estudo, procurou-se controlar algumas destas variáveis, utilizando-se o mesmo inóculo, o mesmo meio de cultura, e a mesma preparação do fármaco. Ficaram a manipulação técnica das diluições seriadas e as características próprias de cada indicador como as possíveis causas de diferenças nas CMIs observadas. Observou-se que o MTT possui maior facilidade para a visualização da mudança de cor, pela troca de amarelo para roxo, sem possibilidades de nuances de cores intermediárias.

A facilidade de execução, rapidez e alta taxa de concordância com o padrão-ouro (MPLJ) observadas no presente trabalho indicam que os testes de susceptibilidade em microplacas, utilizando indicadores de oxi-redução, podem ser alternativa rápida para laboratórios de rotina, que possuam infraestrutura básica para cultivo de *M. tuberculosis*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Milênio/Pronex), FAPERJ, Brasil. A Johns Hopkins University, Processo NIH (n°1U19AI45432-01). À Anna Grazia Marsico do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho,

Ângela Maria Werneck Barreto do Centro de Referência Professor Hélio Fraga e Maria Alice da Silva Telles do Instituto Adolfo Lutz pela gentileza de fornecer as cepas de *M. tuberculosis*.

REFERÊNCIAS

1. Dye C, Schelle S, Dolin P, Pathana V, Raviglione MC. The WHO Global Surveillance and Monitoring Project. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. JAMA. 1999;282:677-86.
2. World Health Organization. TB. Global emergency. WHO report on the tuberculosis epidemic. Geneva; 1994. (WHO/TB/94.177).
3. Kaufmann SHE, Van Embden JD. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. Trends Microbiol. 1993; 1:2-5.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SNPT; 2002.
5. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 1994-1997. Switzerland; 1997. Geneva. (WHO/TB/97.229).
6. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Editora Guanapá, 1994.
7. Franzblau SG, Witzig RS, McCloughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology CMI determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. J Clin Microbiol. 1998;36:362-6.
8. Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999;18:380-3.
9. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1873-4.
10. Inderlied CB, Salfinger M. Antimycobacterial agents and susceptibility tests. In: Murray PR (Editor). Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.
11. Koneman EW, Stephen SD, Janda WM, Schrenberger PC, Winn WC, (Editors). Diagnostic microbiology. Color atlas and textbook. 5a ed. New York: Lippincott; 1997.
12. Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Owthorn VL, Gee B, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1995;33:2324-7.
13. Collins LA, Franzblau SG. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:1004-9.

14. Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:344-7.
15. Gomez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Metha RT. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1842-6.
16. Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miörner 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.
17. Abate G, Mshana RN, Miörner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2:1011-6.
18. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings S J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2720-2.
19. Thrupp LD. Susceptibility testing of antibiotics in liquid media. In: Lorian V (ed). *Antibiotics in laboratory medicine.* Baltimore: Williams & Williams; 1980.