

### Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*

#### *Drug susceptibility tests for Mycobacterium tuberculosis*

César Ugarte-Gil<sup>1</sup>, Mario Ponce Alvarez<sup>1</sup>, David A. J. Moore<sup>3</sup>

#### RESUMEN

Los regímenes de tratamiento no adecuado y los problemas de adherencia del paciente han ocasionado que las tasas de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* hayan aumentado en el mundo, originando así la aparición de las cepas multidrogo resistentes (MDR) y con resistencia extensa a drogas (XDR). El Perú presenta altas tasas de TB-MDR, y ya se han reportado casos de TB-XDR. Las pruebas de sensibilidad buscan detectar los casos con cepas resistentes, permitiendo otorgar el mejor tratamiento al paciente y evitando la propagación de la enfermedad a otras personas. Esta revisión de pruebas de sensibilidad dirigida al médico no especialista, se ha enfocado en las pruebas de sensibilidad disponibles según la Norma Técnica para el control de la Tuberculosis y otras que se encuentran en investigación.

**Palabras clave:** tuberculosis, pruebas de sensibilidad, diagnóstico.

#### ABSTRACT

*Inadequate treatment regimens and poor compliance have led to increased rates of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis around the world, leading to the emergence of multidrug resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) strains. In Peru MDR-TB rates are amongst the highest in the world and XDR-TB cases have been reported for almost a decade. Drug susceptibility tests detect cases with resistant strains, providing the best treatment option to the patient and diminishing the spread of the disease. This review is directed at the non-specialist physician, focusing upon the drug susceptibility tests approved by the National TB Program of Peru and others currently still under research.*

**Key words:** tuberculosis, drug susceptibility tests, diagnosis.

#### INTRODUCCIÓN

A pesar que el tratamiento para *Mycobacterium tuberculosis* es conocido hace casi 50 años, este ha tenido el problema de presentar patrones de resistencia a antibióticos desde el inicio debido a los regímenes de tratamiento no adecuados y a problemas en la adherencia del paciente<sup>1</sup>.

La aparición de cepas MDR (multidrogo resistente, donde por lo menos hay resistencia a la vez de isoniazida y rifampicina) y XDR (que son cepas MDR que además tienen resistencia a quinolonas y una droga de segunda línea inyectable) crea la necesidad de buscar métodos rápidos de diagnóstico para poder iniciar un tratamiento personalizado (“individualizado”), reduciendo así las posibilidades de fracaso y/o recaída, además de evitar la propagación de dicha cepa en la comunidad. La estrategia *DOTS-Plus*, es la recomendada para TB-MDR e incluye esquemas de tratamiento con drogas de segunda línea; en este caso las pruebas rápidas de susceptibilidad podrían permitir determinar el patrón de resistencia, permitiéndole al médico brindar un tratamiento adecuado lo más pronto posible (esta estrategia ya existe en el Perú, siendo además pioneros a nivel mundial).

Las tasas encontradas en el Perú de TB-MDR son de 5,3% en pacientes sin episodio previo de TB y de 24% en aquellos previamente tratados<sup>2</sup>, lo cual muestra un escenario en donde la TB-MDR (encontrándose ya

reportes nacionales sobre la TB-XDR<sup>3</sup>) es un problema creciente en nuestro país; por lo que se hace necesaria la búsqueda de diagnósticos más rápidos de los patrones de resistencia, que permitan la identificación rápida del paciente y su inmediato inicio de tratamiento. Estos métodos diagnósticos son directos o indirectos: directo es cuando se usa la muestra de esputo directamente en la prueba, e indirecto es aquella prueba que se necesita una cepa previa (hay que realizar un cultivo de la muestra de esputo, de donde se sacará la respectiva cepa en la que se realizará la prueba de sensibilidad).

En esta revisión se muestran aquellas pruebas de sensibilidad disponibles según la Norma Técnica para el control de la tuberculosis<sup>4</sup> y algunas otras que están en fase de investigación, principalmente en nuestro país.

#### MÉTODO DE LAS PROPORCIONES

Es uno de los métodos autorizados por la Norma Técnica como prueba de sensibilidad<sup>4</sup>. Este método descrito por Canetti y Grosset<sup>5</sup> compara el número de colonias desarrolladas en medios con diferentes diluciones de antibióticos, respecto a las desarrolladas en los medios sin antibióticos, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco.

Es considerado el estándar de oro para sensibilidad a isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomina, y como ventajas tiene que es altamente reproducible y su bajo costo; sin embargo la gran desventaja es que toma mucho tiempo para emitir un resultado (un promedio de 60 a 90 días<sup>6</sup>), ya que la muestra es primero cultivada, y si el cultivo es positivo para *Mycobacterium tuberculosis*, recién se realiza la prueba de sensibilidad.

1 Médico Cirujano. Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt Universidad Peruana Cayetano Heredia

2 Médico Investigador. Wellcome Centre for Clinical Tropical Medicine, Imperial College London

3 Médico Investigador. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Este tiempo es lo suficientemente largo para, por ejemplo, un paciente con una cepa MDR transmita dicha cepa a la comunidad<sup>7</sup>, o tiempo en el cual el paciente no recibe el tratamiento adecuado, empeorando su condición clínica condicionándolo al fracaso y/o abandono del tratamiento.

En el caso de pirazinamida, se aplica otro método porque este fármaco no es activo contra *M. tuberculosis* bajo condiciones normales de cultivo (cerca a pH neutro), pero si en medios ácidos (pH 5, 5). En este caso, la detección de la enzima pirazinamidasa (enzima del *M. tuberculosis* que hidroliza la pirazinamida a ácido pirazinoico, que es la forma activa de la pirazinamida contra la bacteria; por lo tanto la presencia de la enzima indica que la cepa es sensible y su ausencia, resistencia) o método de Wayne es el estándar de oro. Las colonias de un cultivo fresco en Löwenstein-Jensen (LJ) son sembradas en agar Dubos. Los medios son incubados y posteriormente se añade fosfato de amonio. Si se observa forma una banda rosada luego de añadir el reactivo, esto indicaría que la pirazinamida ha sido hidrolizada a ácido pirazinoico, y se consideraría que la cepa es sensible a pirazinamida<sup>8</sup>.

## PRUEBAS DE ÓXIDO - REDUCCIÓN

Estas pruebas están basadas en la reducción de un indicador añadido al medio de cultivo luego de que el *M. tuberculosis* ha sido expuesto *in vitro* a diferentes antibióticos; logrando detectar la resistencia con el cambio del color del indicador, por este motivo son también llamadas pruebas colorimétricas. Dentro de estas pruebas está la prueba de Griess y las pruebas que usan como indicadores al azul de alamar, MTT y resazurina.

En un metanálisis en que se evalúa los métodos con MTT, azul de alamar y resazurina en cepas provenientes de cultivos positivos para *M. tuberculosis*, se encuentra que la sensibilidad y la especificidad de la resistencia a isoniazida y rifampicina estuvieron en un rango de 89% y 100%<sup>9</sup>. En otro estudio se comparó la prueba de Griess (o también llamada NRA, del inglés: *Nitrate Reductase Assay*), MTT y la resazurina (o también llamada REMA, del inglés: *Resazurin Microtitre Assay*) en cepas provenientes de cultivos positivos para *M. tuberculosis*, encontrándose una sensibilidad y una especificidad en rango de 94% y 100%<sup>10</sup>.

La prueba de Griess fue inicialmente desarrollada en el Instituto Central de Investigación de Tuberculosis en Moscú, Rusia. Consiste en una prueba colorimétrica de detección de sensibilidad de drogas de primera línea<sup>11</sup>, siendo éste es uno de los métodos autorizados por la Norma Técnica como prueba rápida para la detección de resistencia a isoniazida y rifampicina<sup>4</sup>.

Una de las grandes ventajas que tiene este método es que se creó para poder ser realizado con materiales accesibles para cualquier laboratorio<sup>12</sup>. Se basa en la idea de que el *M. tuberculosis* tiene la habilidad de reducir el nitrato a nitrito, que es rutinariamente usado para la identificación

bioquímica de las especies de micobacterias. El medio de cultivo que se usa es el convencional *Löwenstein Jensen* (LJ) al que se le añade  $\text{NaNO}_3$ , que es usado como sustrato para evaluar la reducción del nitrato.

La presencia de nitrito es fácilmente detectada con reactivos específicos (Reactivo de Griess), los cuales producen un cambio de color. Se considera que el resultado es negativo cuando no hay cambio de color o es un color rosado pálido, y es un resultado positivo si es un color rosado brillante hasta un rojo o violeta<sup>13</sup>. El tiempo promedio para la entrega de resultados es entre 7 a 18 días<sup>13</sup> luego de haber obtenido el cultivo positivo (método indirecto) o 21 a 28 días<sup>14</sup> si se aplica a una muestra de esputo frotis positivo.

Comparado con el método de las proporciones, el método de Griess tiene una sensibilidad de 100, 100, 82,1 y 92,2% y una especificidad del 100, 100, 92,3 y 100% para detección de resistencia a isoniazida, rifampicina, estreptomycin y etambutol respectivamente<sup>15</sup>.

Este método ya se ha estado comenzando a implementar a nivel público en el Perú, encontrándose una mejora real en la disminución del tiempo de espera para los resultados<sup>16</sup>.

## MICROSCOPIC OBSERVATION DRUG SUSCEPTIBILITY (MODS)

Es un método de diagnóstico rápido desarrollado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia que permite tanto la detección como la realización de la prueba de susceptibilidad directa a drogas de primera línea<sup>17</sup>. Es también un método rápido autorizado por la Norma Técnica para la detección de resistencia a isoniazida y rifampicina<sup>4</sup>. Se basa en tres principios:

1. *M. tuberculosis* crece más rápido en medios líquidos en comparación con medios sólidos.
2. La morfología del *M. tuberculosis* en cultivos líquidos es característica y reconocible, la que consiste en cordones formados por los microorganismos. Por medio de un microscopio de luz invertido se examinan placas con una delgada capa del medio Middlebrook 7H9 y sembradas con esputo decontaminado, de esta manera el *M. tuberculosis* se puede detectar antes que sea visible a simple vista.
3. La incorporación de drogas anti-TB permite realizar susceptibilidad a rifampicina e isoniazida.

En un ensayo clínico realizado en nuestro país<sup>18</sup> reportan un tiempo promedio de positividad del cultivo y de la prueba de susceptibilidad de siete días, teniendo además una sensibilidad y especificidad de 97,8% y 99,6% respectivamente.

En el caso de pacientes con riesgo para TB (por presencia de sintomatología sugerente o factores de riesgo para TB o TB-MDR) el cultivo de una segunda muestra no incrementó la tasa de detección de TB<sup>18</sup>. En comparación

con el método de proporciones y el sistema MBBacT, MODS tuvo una concordancia del 100% para rifampicina, 97% para isoniazida, 99% rifampicina e isoniazida, 95% para etambutol y 92% para estreptomycin<sup>18</sup>.

En otro estudio realizado en Etiopía se ha encontrado una sensibilidad de 92% y una especificidad de 99,5% para detectar TB-MDR<sup>19</sup>.

Este método, debido a su bajo costo y su rapidez para detectar TB-MDR, está en proceso de implementación en el Perú, se espera ver en dos años el impacto de este método en el sector público.

Las principales limitaciones de este método son la necesidad de un microscopio invertido y el entrenamiento para reconocer la formación de cordones.

### PRUEBAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TESTS; NAAT)

Son métodos para diagnóstico de *M. tuberculosis*, siendo una de las técnicas más usadas para la amplificación la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); este grupo de pruebas demoran 3-6 horas en procesar una muestra<sup>20</sup>. Ejemplos de estas pruebas son el Amplified *M. tuberculosis* Direct test® (AMTD; GenProbe Inc.), el Amplicor MTB test® (Roche) y el Cobas Amplicor® (Roche). Todos ellos se encuentran aprobados por la FDA para detección de *M. tuberculosis* en muestras de esputo.

Uno de estos métodos NAAT que permite ver patrón de sensibilidad es el llamado INNO-LiPA Rif TB® (Innogenetics), el cual consiste en una amplificación mediante la reamplificación de una región de 70 pb del gen *rpoB* que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa presente en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, seguida de una hibridación reversa. La biotina que actúa de marcador se incorpora durante la fase de amplificación, así el producto amplificado biotinilado es posteriormente desnaturalizado e hibridado con 10 sondas oligonucleótidas inmovilizadas en una tira reactiva a modo de líneas paralelas. El híbrido se detecta mediante una reacción colorimétrica que está automatizada (AUTOLiPA®) completándose el ensayo en aproximadamente 12 horas, sirviendo para detectar el *M. tuberculosis* y al mismo tiempo la resistencia a la rifampicina.

En un metanálisis se encontró que INNO-LiPA® tuvo una sensibilidad mayor al 95% y una especificidad del 100% en las pruebas realizadas en cepas aisladas; y en muestras directas tuvo una especificidad del 100% y una sensibilidad en el rango del 80% al 100%<sup>21</sup>.

Una de las limitaciones del INNO-LiPA® es que el resultado debe ser interpretado cuidadosamente en zonas con baja prevalencia de resistencia a rifampicina (puede tener un valor predictivo positivo de solo 66%, es decir un falso positivo por cada dos verdaderos positivos)<sup>22</sup>. Otro punto a considerar es su costo, ya

que esta alrededor de US\$ 45 (dólares americanos) cada muestra<sup>23</sup>, lo cual lo hace costoso para países con pocos recursos, además del entrenamiento especial para el personal de laboratorio.

El Genotype MTBDRplus® (Hain Lifescience, GmbH, Germany), es otra prueba NAAT, que se usa en cepas aisladas de medios sólidos o líquidos (método indirecto), como también de muestras de esputo frotis positivo (método directo). Como la prueba de INNO-LiPA®, esta es una prueba de PCR que detecta *M. tuberculosis* y mutaciones específicas del gen *rpoB*, además de mutaciones específicas en el gen *katG* (que indica resistencia de alto nivel para isoniazida) y en el gen *inhA* (que indica resistencia de bajo nivel para isoniazida). En comparación con el cultivo y prueba de susceptibilidad en MGIT-960 o método de proporciones en medio sólido (agar Middlebrook 7H11), esta prueba tuvo una sensibilidad y especificidad de 98,4% y 99,1% respectivamente, para detectar resistencia a rifampicina; y en el caso de resistencia a isoniazida, 91,4% y 99,7% de sensibilidad y especificidad respectivamente<sup>5</sup>.

Una consideración importante es que los NAAT no pueden ser usados para monitorizar el tratamiento, debido a que pueden detectar bacterias no viables, lo cual sería un resultado falso positivo.

### BACTEC MGIT 960

El método de cultivo bacteriológico automatizado BACTEC MGIT 960® (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc.) permite obtener resultados de pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas en un menor tiempo que el método de las proporciones y a gran escala (permite 960 cultivos), sin embargo tiene un costo mucho más alto. A diferencia del BACTEC 460®, el BACTEC MGIT 960® presenta la ventaja considerable de ser un método no radioactivo lo cual lo hace más seguro para el personal de laboratorio<sup>25</sup>.

Este sistema automatizado usa MGIT, que contiene el medio de cultivo Middlebrook 7H9, detectando consumo de O<sub>2</sub> mediante unos sensores fluorométricos. Un aspecto relevante del medio MGIT es que los tubos poseen tapones tipo rosca, evitando el uso de agujas y jeringuillas. Los resultados se reportan como positivos o negativos y en unidades de crecimiento. La tasa de cultivos aislados por el BACTEC MGIT 960® es mejor que en el medio LJ (80-100% contra 59,7-87,2%)<sup>26</sup>.

En relación a la capacidad del BACTEC MGIT 960® para dar resultados de sensibilidad a drogas de primera línea, se ha encontrado una sensibilidad de 100% para las cuatro drogas (isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomycin) y un rango de especificidad de 89,8% para estreptomycin hasta 100% para rifampicina; siendo el tiempo promedio para dichos resultados de 6,5 días<sup>27</sup> (método directo) y 9,9 días adicionales<sup>28</sup> (método indirecto).

## PRUEBAS CON FAGOS

Estas pruebas se basan en la habilidad de los micobacteriófagos de infectar y replicarse en los *M. tuberculosis* viables. Existen principalmente dos tipos de tests basados en fagos usados para la detección de *M. tuberculosis*<sup>7,29,30</sup>

1. Los bacteriófagos infectan los *M. tuberculosis* en la muestra. Luego la muestra es tratada con un virucida potente, destruyendo los fagos que no han infectado ninguna bacteria, y posteriormente el virucida es neutralizado. Los fagos que ha infectado a los *M. tuberculosis* se replican y luego se liberan. Estos fagos liberados son amplificados y posteriormente son detectados usando micobacterias de rápido crecimiento, no patogénicas, que se encuentran en una placa de agar y soportan la replicación del fago (así como de esta especie de micobacterias). El resultado se puede observar a simple vista, como placas claras, correspondientes a las zonas donde ha habido muerte celular secundaria (las micobacterias no patogénicas en la placa) a la replicación del fago<sup>30</sup>. Este tipo de pruebas en casos con baciloscopia positiva tiene una sensibilidad de 29-87% y una especificidad de 60-88%; y en casos con baciloscopia negativa una sensibilidad de 13-78% y una especificidad de 89-99%<sup>31</sup>. FASTPlaqueTB® (Biotec Laboratories Ltd, Reino Unido), es un ejemplo comercial de este tipo de prueba, usando el micobacteriófago D29 permite la detección de *M. tuberculosis* pero no realiza prueba de sensibilidad. FASTPlaque-RIF®, es una versión que permite la detección resistencia a rifampicina en 48 horas de un cultivo positivo<sup>30</sup>.

2. El otro, detecta la luz producida por fagos con el gen de luciferasa que han infectado los *M. tuberculosis* vivos. Este método fue desarrollado como una prueba de sensibilidad rápida. La principal desventaja es que requiere un periodo de cultivo antes de realizar la prueba.

En el caso de la detección de resistencia a rifampicina, los resultados son variables, sensibilidad 86-100% y especificidad 73-99%<sup>31</sup>. Estas pruebas pueden ser una alternativa a los NAAT para la detección de casos con baciloscopia negativa a un costo menor<sup>7</sup>. La desventaja de estas pruebas es que requieren de la infraestructura necesaria para los cultivos de micobacterias de rutina<sup>29</sup>. En un estudio realizado en nuestro país<sup>32</sup> se usó una prueba basada en el bacteriófago D29, se reportó para rifampicina una sensibilidad de 100% y especificidad de 98%; y para isoniazida 80,4% de sensibilidad y 80,8% de especificidad.

## CONCLUSIONES

El éxito del tratamiento de la tuberculosis depende de muchos factores, como tratamiento y apoyo al paciente; sin embargo, debido al problema existente de tuberculosis MDR, es imperativo que se universalice las pruebas de sensibilidad (que sean rápidas y económicas para que estén a la alcance de nuestra realidad) a todos los pacientes con diagnóstico de tuberculosis, ya que permitirá un

tratamiento adecuado con la consiguiente recuperación integral del paciente, además que a largo plazo permitirá no seguir favoreciendo la aparición de nuevas cepas resistentes y el aumento de los casos de tuberculosis MDR y XDR.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Iseman M. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 1993; 329: 784-91.
2. TB Country File: Peru. [http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/PDF\\_Files/per.pdf](http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/PDF_Files/per.pdf). (Visitado 26 de junio del 2008).
3. Mendoza A, Asencios L, Quispe N, Leo E. Evidencia de tuberculosis con resistencia extendida a drogas de segunda línea (TB XDR) en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2007; 24 (3): 313-314.
4. Norma Técnica. Estrategia Nacional de Salud de Tuberculosis. <ftp://ftp2.minsa.gob.pe/descargas/dgsp/ESN-tuberculosis/normaspublicaciones/NTSTBC.pdf>. Ministerio de Salud. Perú. 2006 (revisada el 15 de mayo del 2008).
5. Canetti G, Rist N, Grosset J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev Tuberc Pneumol* 1963; 27: 217-272.
6. Piffardi S, Luna A, Sakurada A, Lepe R. Evaluación comparativa del método automatizado BACTEC MGIT 960 con el método de las proporciones para determinar susceptibilidad a drogas antituberculosas en Chile. *Rev Chil Enf Respir* 2004; 20: 139-143
7. Perkins M, Cunningham J. Facing the Crisis: Improving the Diagnosis of Tuberculosis in the HIV Era. *J Infect Dis* 2007; 196: S15-S27.
8. Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 327-331.
9. Anandi M, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 175-183
10. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 500-505
11. Ängeby K, Klintz L, Hoffner S. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2): 553-555.
12. Baylan O, Kisa O, Albay A, Doganci L. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of TB and determination of antituberculosis drug susceptibility. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 772-777.
13. Solis LA, Shin SS, Han LL, Llanos F, Stowell M, Sloutsky A. Validation of a rapid method for detection of *M. tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Perú. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9(7): 760-764.
14. Musa H, Ambroggi M, Souto A, Ängeby K. Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a Nitrate Reductase Assay Applied Directly on Microscopy-Positive Sputum Samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (7): 3159-3161

15. Coban AY, Birinci A, Ekinçi B, Durupinar B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24 (3): 304-306.
16. Shin SS, Yagui M, Ascencios L, Yale G, Suarez C, Cegielski P, et al. Scale-up of multidrug-resistant tuberculosis laboratory services, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (5): 701-708.
17. Caviedes L, Lee T, Gilman R, Sheen P, Montenegro S. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation in Broth Cultures. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1203-1208.
18. Moore D, Evans C, Gilman R, Caviedes L, Friedland J. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006; 355 (15): 1539-1550.
19. Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, Girmachew F, Demessie D, Lemma E. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4): 1093-1097.
20. Ling D, Flores L, Riley L, Pai M. Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. *PLoS ONE* 2008; 3 (2): e1536.
21. Morgan M, Shriprakash K, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of Rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 62
22. Viveiros M, Leandro C, Rodrigues L, Almeida J, Bettencourt R, Amaral L, et al. Direct application of the INNO-LiPA Rif. TB line-probe assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains and detection of rifampin resistance in 360 smear-positive respiratory specimens from an area of high incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43:4880-4884.
23. Morcillo N, Zumarraga M, Alito A, Dolmann A, Schouls L, van Soolingen D, et al. A low cost, home made, reverse-line blot hybridization assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 1-7
24. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR). World Health Organization. Molecular Line Probe Assays For Rapid Screening of Patients at Risk of Multi-Drug Resistant Tuberculosis (MDR-TB). 2008..
25. Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti M. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 607-610.
26. Sishi S, Sinha P, Malhotra B, Pal N. A comparative study for the detection of mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25 (4): 383-386
27. Bemer P, Palicova F, Rusch-Gerdes S, Drugeon HB, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 150-154.
28. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Rüsç-Gerdes S, et al. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:364-368.
29. Kalantri S, Pai M, Pascopella L, Riley LW, Reingold AL. Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and metaanalysis. *BMC Infect Dis* 2005; 5 (1): 59.
30. Seaman T, Trollip A, Mole R, Albert H. The use of a novel phage-based technology as a practical tool for the diagnosis of tuberculosis in Africa. *African J Biotechnol* 2003; 2 (2): 40-45.
31. Pai M, Kalantri S, Pascopella L, Riley LW, Reingold AL. Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. *J Infect* 2005; 51 (3): 175-187.
32. Chauca J, Palomino JC, Guerra H. Evaluation of rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage D29-based assay. *J Med Microbiol* 2007; 56: 360-364

## CORRESPONDENCIA

César Ugarte-Gil

[01215@upch.edu.pe](mailto:01215@upch.edu.pe)