

Determinación de la concentración inhibitoria mínima en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica del Alamar azul

Shirley Acosta Montes Bact. MSc.*
Clara Inés León MSc**
Aura Lucía Leal MD MSc*

Resumen

Objetivo: estandarizar y optimizar la técnica colorimétrica de Alamar azul y compararla con el método de referencia de las proporciones múltiples.

Materiales y métodos: se utilizaron 11 cepas de referencia de *M. tuberculosis*, con las cuales se estandarizó la técnica del Alamar azul, para cuatro medicamentos antituberculosos: estreptomycin, isoniacida, rifampicina y etambutol. Se determinó la reproducibilidad de la técnica. Se compararon los resultados obtenidos en el método de referencia de las proporciones múltiples, con las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) obtenidas en la técnica del Alamar azul. Se propusieron puntos de corte de sensibilidad y resistencia para los medicamentos estudiados. **Resultados.** La técnica del Alamar azul quedó estandarizada en los siguientes aspectos: utilización del inóculo a partir de medio sólido (Owaga-Kudoh), a una concentración 1:25, realizando las diluciones de los antibióticos fuera de la placa. Las determinaciones de la CIM se

obtuvieron entre 8 y 10 días. Los puntos de corte de sensibilidad y resistencia, propuestos para estreptomycin fueron: $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 2.0 \mu\text{g/ml}$, para isoniacida; $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$, para rifampicina; $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$ y para etambutol; $\leq 8.0 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 16.0 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. La concordancia total entre los dos métodos fue del 95% para todas las drogas estudiadas. **Conclusiones:** la técnica colorimétrica del Alamar azul es rápida, efectiva y económica para la detección temprana de multiresistencia, lo cual representa una ayuda valiosa especialmente en pacientes de alto riesgo de tuberculosis multiresistente y podría implementarse para apoyo de programas de vigilancia y control de la tuberculosis. **Palabras claves:** *Mycobacterium tuberculosis*, susceptibilidad, Alamar azul, multiresistencia, proporciones múltiples. ☼

Infectio 2004; 8(3): 194-202

Recibido para evaluación: 12/04/2004 - Aprobado para publicación: 02-08/2004

* Laboratorio de Micobacterias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

** Laboratorio de Micobacterias, Instituto Nacional de Salud, Subdirección de Investigación y Desarrollo institucional. Bogotá, Colombia.

Correspondencia: Shirley Acosta Montes, Calle 163 A # 28-60 Laboratorio Clínico Fundación Cardiolinfantil
E-mail: shiraco5@hotmail.com, Colombia.



Introducción

La tuberculosis es una de las principales causas de muerte en el mundo; cada año se detectan cerca de ocho millones de casos nuevos y tres millones de muertes por esta causa (1). A pesar de la disponibilidad de diversos fármacos eficaces, la tuberculosis ha sufrido un incremento y se ha convertido en un problema mundial de salud pública, debido a la aparición del VIH-SIDA, la multirresistencia y a las deficiencias de los programas de control de la tuberculosis (2).

El estudio mundial de farmacoresistencia realizado entre 1996 y 1999 en 58 países, mostró que está distribuida en todo el mundo y constituye un serio problema en los países del este de Europa como Estonia, Lituania y Rusia. En Latinoamérica la prevalencia de multirresistencia no supera el 3%, (3-5).

Los pacientes infectados con cepas multirresistentes son difíciles de curar y representan un sobrecosto económico y social para la comunidad y los programas de control (4). Los métodos de referencia utilizados actualmente para la determinación de susceptibilidad a los medicamentos son: el método de las proporciones múltiples y el método Bactec 460 (5). El primero tiene la desventaja que requiere seis semanas para obtener resultados (6) y el método Bactec 460 es rápido pero utiliza equipos costosos y material radioactivo que dificulta la implementación en los laboratorios de rutina, por lo tanto, es importante introducir nuevas metodologías rápidas, fáciles de realizar y que permitan detectar tempranamente la multirresistencia en grupos de pacientes de alto riesgo. Se han descrito un número de métodos nuevos para determinar susceptibilidad al *M. tuberculosis* como: método Mycobacterial Growth Indicador Tube (MGIT), E- test, test luciferasa, técnicas moleculares y otros (4, 7, 8, 9, 10).

Dentro de esta perspectiva se han venido trabajando técnicas rápidas, como la técnica colorimétrica del Alamar azul, de la cual hay muchos estudios; sin embargo no se han definido finalmente las CIM que corresponden a los puntos de corte. La prueba de Alamar azul utiliza un colorante vital como indicador de crecimiento y viabilidad, el cual produce una reacción de oxidoreducción en presencia de células vivas y viables, que se evidencia por cambio de color de azul a fucsia. Inicialmente fue utilizado por Yajko en 1995 para determinar la susceptibilidad de *M.*

tuberculosis a los medicamentos (11). Estudios posteriores han mostrado que tiene buena concordancia con el método de las proporciones múltiples (12-15). Otros estudios sobre Alamar azul son necesarios para encontrar los puntos de corte y poder clasificar por medio de la técnica las cepas sensibles y resistentes, definiendo estos puntos para ser usados mundialmente y no por cada uno de los investigadores.

El objetivo del estudio fue estandarizar y optimizar la técnica colorimétrica del Alamar azul a las condiciones de nuestro medio y comparar los resultados con los obtenidos en el método de las proporciones múltiples en su variante simplificada en el medio de Lowstein Jensen.

Materiales y métodos

1. Cepas: se utilizaron 10 cepas de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes del Instituto de Salud Pública de Chile que es el Laboratorio de Referencia Supranacional para Colombia y como control de sensibilidad la cepa de referencia H37Rv. Las cepas se mantuvieron a -70°C en medio MSTA (sauton tween albúmina modificado) hasta el momento de su uso. A cada una de las cepas se les determinó los patrones de susceptibilidad por el método de las proporciones múltiples para rifampicina, isoniacida, etambutol y estreptomycin, a sus respectivas concentraciones críticas: estreptomycin 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, isoniacida 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, rifampicina 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, etambutol 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; la lectura se realizó a las seis semanas. Para la interpretación de los resultados, se tuvo en cuenta la proporción crítica de cada uno de los medicamentos, que es del 1%. Se consideró un aislamiento resistente a cualquiera de los cuatro medicamentos, cuando presentó un crecimiento igual o superior al 1% en el medio Lowstein Jensen adicionado de medicamento con respecto al crecimiento obtenido en el medio sin medicamento (6).

2. Antibióticos. Se utilizaron cuatro antibióticos: estreptomycin, isoniacida, etambutol y rifampicina. Se prepararon soluciones stock de cada uno de los antibióticos y se conservaron a -70°C máximo un mes. A partir de esta solución stock se preparó una solución de trabajo la cual fue cuatro veces más concentrada que la concentración máxima utilizada en las pruebas. A partir de la solución de trabajo se prepararon seis diluciones progresivas en base dos de cada uno de los antibióticos en caldo Middlebrook

7H9. Los rangos de concentración estudiados fueron para estreptomycin 8-0.25 µg/ml; para isoniacida 1.0-0.031 µg/ml; para rifampicina 2.0-0.062 µg/ml y para etambutol 32-1.0 µg/ml.

3. Estandarización de la técnica colorimétrica del Alamar azul

La metodología utilizada fue la propuesta en el estudio de Franzblau (12), a la cual se le estandarizaron algunos parámetros críticos, con el fin de optimizar y adecuar la técnica a las condiciones de nuestros laboratorios. Los parámetros que se estandarizaron en esta metodología fueron:

3.1. Tiempo de aparición del crecimiento: se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos estériles de fondo plano (Falcon Ref 3072 Becton Dickinson). Para cada cepa se utilizaron seis pozos a los cuales se adicionó 100 µl de medio de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco) estéril y 100 µl de una suspensión de *M. tuberculosis* en estudio, se llevó a incubación por 7 a 12 días y se determinó el día óptimo de crecimiento por medio del revelado con Alamar azul.

3.2. Concentración del inóculo: se preparó una suspensión de *M. tuberculosis* a partir de medio sólido y de medio líquido, la cual se igualó a la opacidad del tubo No.1 de la escala de MacFarland y a partir de esta suspensión se realizó una dilución 1:25 y 1:50, utilizando como diluyente medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC. Estas dos concentraciones se probaron para determinar cual dilución era óptima para la prueba. Se corrieron las pruebas en tres oportunidades diferentes.

3.3. Utilización del inóculo a partir de medio sólido y líquido: para obtener el inóculo a partir de medio líquido se realizó una siembra de cada una de las cepas que estaban a -70°C, en 5 ml de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, se llevaron a incubar por 15 días y se realizó una suspensión, la cual se igualó al tubo No. 1 de la escala de MacFarland. Para el medio sólido se realizó una resiembra en medio Lowenstein Jensen y a partir de las colonias de cuatro semanas de incubación se preparó una suspensión con una opacidad igual a la del tubo No. 1 de la escala de MacFarland; estas suspensiones se utilizaron para realizar la técnica del Alamar azul en tres oportunidades diferentes.

3.4. Preparación de las diluciones de los antibióticos: en este parámetro se compararon los resultados realizando las diluciones de los antibióticos dentro y fuera de la placa. Para realizar las diluciones dentro de la placa se adicionaron 100 µl de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC estéril a seis pozos, por cada uno de los antibióticos estudiados; al primer pozo se le adicionó 100 µl de la solución de trabajo, se mezcló y a partir de esta se tomaron 100 µl y se pasaron al pozo No. 2 y sucesivamente se realizaron diluciones en base dos hasta terminar en el sexto pozo. Las diluciones de los antibióticos fuera de la placa se realizaron en tubos, adicionando igual cantidad de medio Middlebrook 7H9 y solución de trabajo del antibiótico al primer tubo y a partir de ésta se realizaron diluciones progresivas en base dos hasta terminar en el sexto tubo. Para este parámetro se realizaron las pruebas en tres oportunidades diferentes.

Ensayo colormétrico del Alamar azul

Se utilizaron microplacas de 96 pozos estériles de fondo plano con tapa, las cuales estaban numeradas en la parte superior de 1-12 y por la parte lateral izquierda identificada con letras de la A-H (figura 1). Por cada placa se sembraron dos aislamientos. El aislamiento uno fue probado en las columnas 2 a 6 y en las filas B a G. El aislamiento dos fue sembrado en las columnas 7 a 11 y en las filas B a G. A los pozos de la periferia se les adicionó 200 µl de agua destilada estéril, para evitar la evaporación. A las filas de la B a la G y columnas de 2 a 11, se le adicionaron 100 µl de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC. A los pozos de las columnas 3 a 11 de la fila B se le adicionaron 100 µl de las drogas estudiadas cuatro veces más concentradas que la concentración más alta a utilizar de cada antibiótico. Con la pipeta multicanal, se mezcló y transfirió 100 µl al siguiente pozo y así sucesivamente hasta terminar en la dilución en la fila G, se descartó 100 µl de la última dilución. Se adicionó 100 µl de la suspensión de *M. tuberculosis* a cada pozo que contenía la droga y también a los controles libres de droga. A los pozos G6 y G11 se les adicionó 198 µl de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC y 2 µl de la suspensión del inóculo, que correspondió al control diluido 1:100 y contenía el 1% de la población total de micobacterias, útil para la lectura



FIGURA 1

Esquema de montaje de la placa para la técnica del Alamar azul

CEPA 1						CEPA 2						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	A
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	B
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	C
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	D
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	E
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	F
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	G
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	H
	S	I	R	E	C		S	I	R	E	C	

○: agua destilada ○: control de medio de cultivo
 ○: control libre de droga ○: control diluido 1:100
 S: estreptomycin I: isoniacida R: rifampicina
 E: etambutol C: control

de la prueba. Los rangos de las concentraciones finales de las diluciones de las drogas fueron: estreptomycin: 0.25-8.0 µg/ml, isoniacida: 0.031 – 1.0 µg/ml, rifampicina: 0.062 – 2.0 µg/ml y etambutol: 1.0 – 32.0 µg/ml. A los pozos B6 y B11 se les adicionó 200 µl de Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, que corresponden a los controles de medio de cultivo. Las placas se taparon y sellaron y se llevaron a incubación por ocho días. Al día octavo se adicionó 22 µl en solución Alamar azul-tween 80 (20 µl de Alamar azul y 2 µl de tween 80 al 20%) a los pozos C6 y C11. Se reincubó por 24 horas. Si los pozos cambiaban de color azul a fucsia, se le adicionaba la solución de Alamar azul-tween 80 a toda la placa y se procedía a llevarla a incubación por 24 horas más. Si el pozo no cambiaba de color, se le adicionaba la solución al segundo pozo control y así sucesivamente (figura 2).

La lectura se realizó teniendo como referencia los controles. Primero se leyó el control de medio de cultivo, que debió permanecer azul, lo cual indicó que no había contaminación. Luego se leyeron los pozos correspondientes a los antibióticos y se determinó la CIM, esto se hizo comparando el color de los pozos con el color del pozo diluido 1:100. La CIM correspondió al pozo de más baja concentración de antibiótico en el cual la intensidad de color fue menor o igual al pozo control diluido.

Análisis de los resultados: se obtuvieron los puntos de corte de sensibilidad y resistencia para la técnica del Alamar azul teniendo como referencia los resultados obtenidos en la técnica de las proporciones múltiples. Se determinó la concordancia entre las dos metodologías ensayadas. Se consideró como reproducible un resultado igual y hasta una diferencia de +/- 1 dilución para la técnica del Alamar azul (13,16). Se determinó la reproducibilidad de las pruebas utilizando los resultados obtenidos de los tres ensayos realizados en oportunidades diferentes.

Resultados

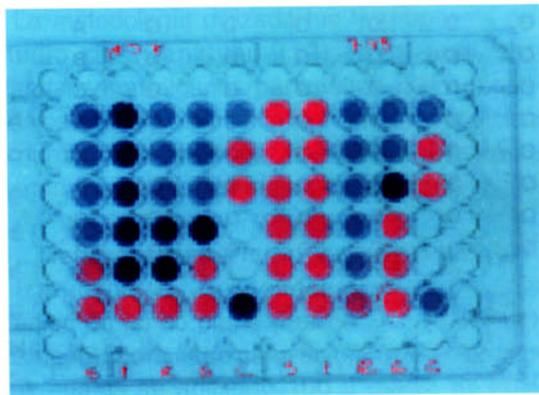
Estandarización de la técnica

Tiempo de aparición del crecimiento: cuando se utilizó un inóculo a partir de medio líquido en una concentración de 1:25 el tiempo de crecimiento de las micobacterias osciló entre 8 y 9 días y con el inóculo 1:50 osciló entre 9 y 10 días. Cuando se utilizó el inóculo a partir de medio sólido en una concentración 1:25 el tiempo de crecimiento osciló entre 8 y 10 días y con una concentración 1:50 entre 9 y 12 días.

Concentración del inóculo. En nueve cepas no se observaron diferencias en la determinación de

FIGURA 2

Ensayo colorimétrico del Alamar azul para las cepas 760 y 747 (foto) Pozos color púrpura: reducción del colorante por presencia de micobacterias, pozos color azul: no hay reducción del colorante, ni presencia de micobacterias.



la CIM al utilizar concentraciones del inóculo 1:25 y 1:50. En las dos cepas restantes se observó una diferencia de una dilución en rifampicina e isoniacida.

Utilización del inóculo a partir de medio sólido y líquido. En siete cepas no se encontraron diferencias en la determinación de la CIM al utilizar un inóculo a partir de medio sólido ó líquido. En cuatro cepas se encontraron diferencias de una dilución.

Preparación de las diluciones de los antibióticos. Cuando las diluciones se realizaron fuera de la placa en la determinación de la CIM, la reproducibilidad fue del 100%, cuando las diluciones se prepararon dentro de la placa la reproducibilidad bajó al 92%.

Resultados de la determinación de la CIM

Prueba de susceptibilidad a estreptomycin. Las cuatro cepas sensibles a estreptomycin por el método de las proporciones múltiples, presentaron una CIM por el método del Alamar azul entre 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$, una cepa que fue sensible por el método de las proporciones múltiples fue resistente por Alamar azul con una CIM de 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (figura 3a). En las seis cepas resistentes la CIM por Alamar azul osciló entre

2 y 8.0 $\mu\text{g/ml}$. Los puntos de corte de $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 2.0 \mu\text{g/ml}$, fueron los que mejor discriminaron las cepas sensibles y resistentes respectivamente. Usando los anteriores criterios el porcentaje de concordancia entre las dos metodologías fue de 92%.

Prueba de susceptibilidad a isoniacida. En cuatro cepas sensibles a isoniacida por el método de las proporciones múltiples, la CIM por el método del Alamar azul osciló entre 0.06 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$. En las siete cepas resistentes la CIM por Alamar azul fue > 1.0

Prueba de susceptibilidad a rifampicina. En siete cepas sensibles a rifampicina por el método de las proporciones múltiples, la CIM por el método del Alamar azul osciló entre 0.125 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$. En las cuatro cepas resistentes por el método de las proporciones múltiples la CIM por Alamar azul osciló entre 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4a). Los puntos de corte de $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$, fueron los que mejor discriminaron las cepas sensibles y resistentes respectivamente. Usando los anteriores criterios el porcentaje de concordancia entre las dos metodologías fue del 100%.

Prueba de susceptibilidad a etambutol. En seis cepas sensibles a etambutol por el método de las proporciones múltiples, la CIM por el método del Alamar azul osciló entre 2.0 y 4.0 $\mu\text{g/ml}$. En las cuatro cepas que fueron resistentes por el método de las proporciones múltiples la CIM por Alamar azul osciló entre 16.0 - 32 $\mu\text{g/ml}$ (figura 4b). Una cepa que fue resistente por el método de las proporciones múltiples, por el método del Alamar azul presentó una CIM de 8.0 $\mu\text{g/ml}$. Los puntos de corte de $\leq 8.0 \mu\text{g/ml}$ y $\geq 16.0 \mu\text{g/ml}$, fueron los que mejor discriminaron las cepas sensibles y resistentes respectivamente. Usando los anteriores criterios el porcentaje de concordancia entre las dos metodologías fue del 92%.

Discusión

En tuberculosis la resistencia a los medicamentos es un problema de gran magnitud como lo demuestra el Estudio de Vigilancia Mundial de la Farmacoresistencia (5), esto tiene como consecuencia la utilización de medicamentos de segunda línea que son más costosos y tóxicos, además se prolonga la cadena de transmisión del bacilo (7).

En el mundo se discute la necesidad de realizar pruebas de susceptibilidad a todos los pacientes



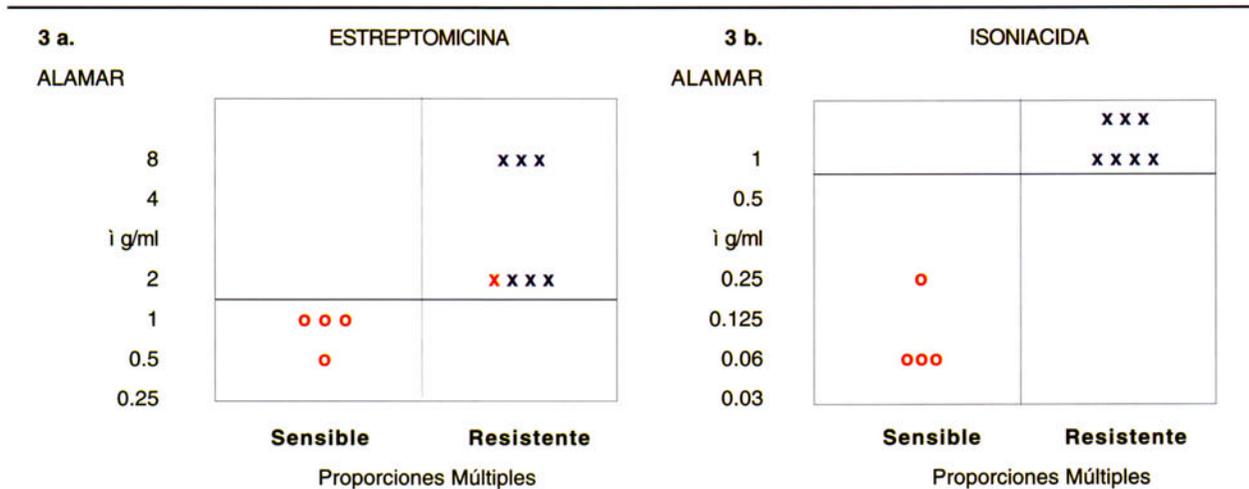
que se diagnostican por primera vez (17), para esto es importante analizar los beneficios que se pueden obtener con esta medida, que dependen de una prueba que se ajuste a la definición de costo-beneficio.

Las técnicas de susceptibilidad a los

medicamentos utilizados hasta ahora para *Mycobacterium tuberculosis* como el método de las proporciones múltiples tiene la limitante del tiempo de obtención de los resultados y el Bactec 460 su alto costo y la utilización de material radioactivo. En el mundo se están estudiando diversas técnicas

FIGURA 3

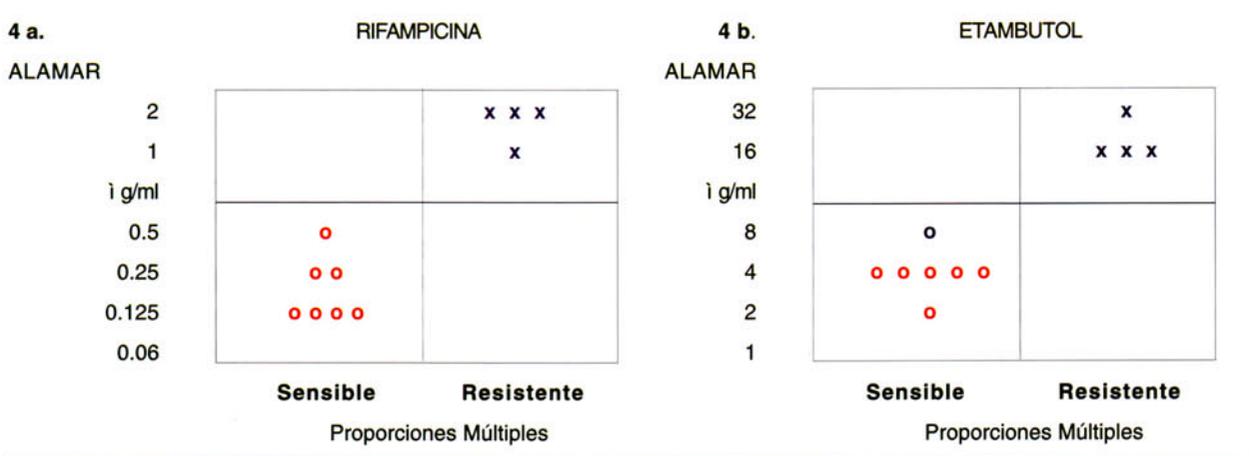
Comparación de la CIM obtenidas por el método Alamar azul y los resultados de las proporciones múltiples para estreptomycin e isoniacida.



SENSIBLE: o y RESISTENTE: x

FIGURA 4

Comparación de la CIM obtenidas por el método Alamar azul y los resultados de las proporciones múltiples para rifampicina y etambutol



SENSIBLE: o y RESISTENTE: x

con el fin de disminuir el tiempo, el costo y que sean fáciles de realizar como son: las técnicas colorimétricas, E-test, M-GIT, test de luciferasa y técnicas moleculares (4, 7, 8, 9, 10).

Las técnicas colorimétricas, se han estudiado desde hace varios años, utilizando inicialmente colorantes vitales como indicadores de crecimiento y viabilidad como el MTT (dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide) (16), pero se encontraron inconvenientes como la toxicidad y la utilización de un reactivo adicional de extracción para evidenciar el cambio de color; más adelante se empleó el Alamar azul en la determinación de susceptibilidad de bacterias gram positivas y gram negativas, hongos y levaduras con buenos resultados(18). En 1995 Yajko y col. utilizaron por primera vez la técnica del Alamar azul para determinar la susceptibilidad del *Mycobacterium tuberculosis*, obteniendo buenos resultados y una buena concordancia con el método de las proporciones múltiples (11).

En este estudio se buscó adaptar la técnica del Alamar azul a las condiciones de nuestro medio, teniendo en cuenta que nuestros laboratorios no poseen el mismo grado de complejidad, convirtiéndose esta metodología en una opción factible para ser aplicada en la práctica clínica.

En cuanto a la estandarización del método del Alamar azul, el aporte más importante fue el utilizar el inóculo a partir de medio sólido porque permite reducir el tiempo de obtención de los resultados de 24 días a 10 días, al no realizar el cultivo del aislamiento primario en el medio de Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC previo al montaje de la prueba de susceptibilidad; resultados similares han sido obtenidos en otros estudios (12,15).

La utilización de la concentración del inóculo 1:25, permitió obtener un crecimiento adecuado entre 8 y 10 días, resultados similares se han encontrado en el estudio de Franzblau (12) y Palomino (15), utilizando esta concentración del inóculo.

La realización de las diluciones de los antibióticos fuera de la placa, permite disminuir la probabilidad de contaminación de las pruebas, porque las placas permanecen menor tiempo destapadas durante el proceso, además disminuye el riesgo para el operario.

Los puntos de corte propuestos en este estudio, aunque con la debilidad de haberse analizado con un número reducido de cepas, son comparables

con los propuestos por Franzblau (12) con 34 cepas peruanas, con el estudio de Yajko (11) y con el estudio de Luna y col (14).

La concordancia total del 95%, con el método de las proporciones múltiples, es similar a la encontrada en el estudio realizado por Yajko (97%) y Palomino (97.1%) (11,15) a pesar que el número de cepas fue reducido.

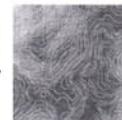
Se pudo observar que utilizando los puntos de corte propuestos, la técnica del Alamar azul tiene buena capacidad de detectar cepas sensibles y resistentes a isoniacida y rifampicina, no sucedió así con estreptomycin y etambutol en las cuales se encontró una discordancia, estos resultados podrían explicarse si recordamos que la estreptomycin y el etambutol son medicamentos bacteriostáticos y no bactericidas. Resultados similares se obtuvieron en la prueba de proficiencia interlaboratorios, para estos medicamentos en el Estudio Mundial de Farmacorresistencia; sin embargo se están realizando estudios con el fin de mejorar la eficacia de los medicamentos (estreptomycin y etambutol) en las pruebas de susceptibilidad (5).

La prueba del Alamar azul tiene un costo menor que la prueba de las proporciones múltiples, debido a que los materiales que utiliza bajan los costos como son: cantidades pequeñas de medio de cultivo, antibióticos, colorante y el tiempo menor empleado por el operario para montar la prueba con respecto a la técnica de las proporciones múltiples.

La técnica del Alamar azul se convierte en una prueba de bajo costo, promisoría para la detección rápida de resistencia y multirresistencia, especialmente en pacientes de alto riesgo de presentar tuberculosis multirresistente y así aportar al clínico herramientas para aplicar un tratamiento adecuado y oportuno, además para servir de apoyo a los programas de control de la tuberculosis.

Una desventaja del formato de microplaca de estas técnicas colorimétricas es la bioseguridad, ya que estas placas requieren el uso de medio líquido y pueden generar aerosoles, sin embargo se ha estudiado la posibilidad de utilizar las metodologías colorimétricas en sistemas cerrados (11,16, 19).

Es importante seguir realizando estudios en este mismo campo, con el fin de probar otras alternativas y así encontrar una metodología que finalmente se adapte a las condiciones de nuestros laboratorios.



Otro colorante como la resarurina que recientemente se ha identificado con el principal componente del Alamar azul, ha mostrado ser una buena opción para la detección de resistencia a rifampicina, lo que la convierte en una buena posibilidad para ser utilizada en posteriores estudios, para medicamentos de primera o de segunda línea empleados en el tratamiento de la tuberculosis. Este colorante se caracteriza por ser de menor costo que otros colorantes utilizados para este fin (20, 21).

Debemos tener en cuenta que el objetivo principal del trabajo fue el de estandarizar la técnica colorimétrica del Alamar azul; sin embargo, se requieren otros estudios con un número representativo de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, para poder realizar un análisis estadístico adecuado y determinar puntos de corte precisos. ☉

Abstract

Objective: to standardize and optimize the colorimetric technique of the Alamar blue assay and to compare to the reference multiple proportions method. **Methodology:** 11 reference strains of *Mycobacterium tuberculosis* were used and standardized with the technique of the Alamar blue assay, for four antituberculosis drugs: streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol. The reproducibility of the technique was determined. The minimum inhibitory concentrations (MICs) obtained with the Alamar blue assay were compared to the multiple proportions method in order to find the cutoff points of resistance and sensibility for each drug. **Results:** in the standardization of the Alamar blue assay the following results were obtained: use of the inoculum starting from solid medium (Owaga-Kudoh) to 1:25 concentration, performing the dilutions of the antibiotics outside of the plates. MICs results were obtained in 8 to 10 days. The cutoff points of sensibility and resistance were respectively: for streptomycin: $\leq 1.0 \mu\text{g/ml}$ and $\geq 2.0 \mu\text{g/ml}$; for isoniazid: $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ and $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$; to rifampin: $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ and $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$; for ethambutol: $\leq 8.0 \mu\text{g/ml}$ and $\geq 16.0 \mu\text{g/ml}$. The global agreement between the the Alamar blue assay and the proportions method was of 95%, for the studied drugs. **Conclusions:** the Alamar blue assay constitutes a rapid technique, simple to perform, and inexpensive. It is useful in the early detection

of multiresistance, is important aspect specially in high risk patients of tuberculosis multiresistance and can be utilized in tuberculosis control programs. **Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Susceptibility, Alamar blue assay, multiresistance, methods proportions.

Referencias

1. **Pablos-Méndez A, Raviglione MD, Lazlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F. et al.** Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *N Eng J Med* 1998; 338: 1641-49.
2. **Organización Panamericana de Salud, Organización Mundial de la Salud.** La salud en las Américas. Indicadores Básicos 1998. Programa Análisis de situación de Salud, División de Salud y Desarrollo humano.
3. **Espinal MA, Lazlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A. et al.** Global Trends in resistance to antituberculosis Drugs. *N Eng J Med* 2001; 344: 1294-303.
4. **Guerrero MI, Suffys PN, Vanderborcht B, De oliveira MM, Cohen IB, León CI.** Comparación de métodos moleculares útiles en la detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis* Multirresistente (MTB-MRD). *Infectio* 2001; 5: 203-11.
5. **WHO.** Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World, Report 2. Prevalence and trends, The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Geneva 2000 WHO/CDS/TB/2000.278.
6. **Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler H., Menon N.** Advances in Techniques of Testing Mycobacterial Drug Sensitivity, and the Use of Sensitivity Tests In Tuberculosis Control Programmes. *Bull WHO* 1969; 41: 21-43.
7. **Heifets LB,** Drug Susceptibility Testing. *Clin Lab Med* 1996; 16: 546-6.
8. **Wanger A, Mills K.** Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by Using Etest. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1672-6.
9. **Hazbon MH, Orozco MS, Librada LA, Tovar R, Weigle KA, Wanger A.** Evaluation of Etest for susceptibility Testing of Multidrug-Resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin microbiol* 2000; 38: 4599-4603.
10. **Sánchez L, Londoño D, Arango AI, Mattar S.** In vitro Activity of Antituberculous Agents Against *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Bogotá, D.C. Colombia Evaluated by the Etest. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 109-12.
11. **Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawton L, Gee B. et al.** Colorimetric Method for

- Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1995; 33: 2324-7.
12. **Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernández A. et al.** Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. J Clin Microbiol 1998; 36(2): 362-6.
 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: 1004-09.
 14. **Luna J, Martínez G, Parra R, Enciso Moreno JA, Torres López J, Quezada F. et al.** Use of receiver operating Characteristic Curves to Assess the performance of a Microdilution Assay for determination of Drug susceptibility of Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 21-7.
 15. **Palomino J.C, Portaels F,** Simple Procedure for Drug susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Using a Commercial Colorimetric Assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 380-83.
 16. **Abate G, Mshana N.** Evaluation of colorimetric Assay Based on 3-(4,5-dimethyl thiazol-2 yl)-1,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 1011-16.
 17. **Heifets LB, Cangelosi GA.** Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. Int J Tuberc Lung Dis 1999; 3: 564-81.
 18. **Pfaller MA and Barry AL.** Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. J Clin Microbiol 1994; 32: 1992-6.
 19. **Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miorner H.** Use of 3-(4,5-dimethyl thiazol-2 yl)-1,5diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 36: 1214-9.
 20. **Lemus D, Martin A, Montoso E, Portaels F, Palomino J.** Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother. 2004; 54: 130-3.
 21. **Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC.** Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 3616-9.