

Título: Evaluación de métodos colorimétricos empleando nicotinamida para la detección rápida de resistencia a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis*

Autores: Dr. Ernesto Montoro Cardoso DrC emontoro@ipk.sld.cu , Lic. Dihadenys Lemus Molina DrC, Lic. Niuris Mirabal Valdés MSc, Lic. Sergio L. Yzquierdo, Téc. Miguel Echemendía Font, Dra. Mariela Madruga Fernández MSc, Dra. Yoslane Milian Samper MSc, Dr. Howard Takiff , Dra. Anandi Martin , Dr. Patrick Van der Stuyf, Dr. Juan Carlos Palomino .

Centro de procedencia: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí (IPK).

Palabras claves: Tuberculosis, resistencia, pirazinamida

Introducción

La tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud a nivel mundial. Cada año se reportan más de 9 millones de casos nuevos y 1.7 millones de muertes. Entre las principales causas de este incremento se destaca el aumento de la resistencia de *M. tuberculosis* a las drogas antituberculosas; en este sentido, la circulación de cepas multidrogoresistentes y la reciente aparición de las cepas extremadamente resistentes vuelven aún más difícil y costoso el control de esta enfermedad, la que pudiera llegar a ser incurable (1).

El tratamiento efectivo de la TB se basa en la aplicación sistemática de la terapia combinada directamente supervisada (estrategia *DOTS*), con fármacos nunca antes empleados para evitar la selección de células resistentes y eliminar todos los bacilos en sus diferentes localizaciones y fases del crecimiento metabólico. Dentro de las drogas de primera línea se incluyen la pirazinamida (PZA), isoniacida (INH), rifampicina (RIF) y etambutol. La PZA constituye una de las drogas más importantes en el tratamiento, la asociación de esta droga con INH y RIF permitió acortar la terapia de 9 a 6 meses. Esta droga ejerce un efecto esterilizante, actuando sobre los bacilos en estado de latencia que persisten en el ambiente ácido del interior de los macrófagos (2).

A pesar de la reconocida actividad *in vivo*, los estudios de susceptibilidad *in vitro* a PZA se han visto limitados debido a que se requiere acidificar el medio de cultivo para que la droga pueda ejercer su efecto bactericida; este ambiente ácido interfiere en el crecimiento de *M. tuberculosis* y algunas cepas no logran desarrollarse. Por otra parte, a un pH mayor, disminuye la actividad de la droga y se obtendría un resultado de resistencia falso (3).

El mecanismo de acción de la PZA aún no se encuentra completamente dilucidado. Varios estudios han propuesto que esta pre-droga una vez que se encuentra en el interior de *M. tuberculosis* es convertida a su forma activa ácido pirazinoico (POA), por acción de la enzima micobacteriana pirazinamidasas/nicotinamidasas (PZAasa), codificada por el gen estructural (*pncA*).

El POA es excretado por difusión pasiva y en condiciones ácidas es convertido en su forma protonada (HPOA), la cual penetra fácilmente a través de la membrana celular. Una vez dentro, el protón es liberado y el POA difunde nuevamente para repetir el ciclo anterior. Debido a los ineficientes mecanismos de eflujo se produce en el citoplasma de *M. tuberculosis* una acumulación de ácido y por tanto una disminución del pH, que afecta el potencial de membrana produciéndose un desequilibrio celular que conlleva a la muerte bacteriana (4-6).

Dentro de los métodos convencionales disponibles para evaluar la susceptibilidad a las drogas antituberculosas, el BACTEC-460 y MGIT-960 son consideradas las herramientas más confiables para los estudios de resistencia a PZA, sin embargo su costosa implementación ha impedido su uso en la mayoría de los laboratorios de países subdesarrollados; a su vez, el BACTEC-460 actualmente está en desuso debido al empleo de compuestos radioactivos (7, 8).

El ensayo enzimático de Wayne (EEW) es considerado una técnica de referencia y ha sido incorporado en algunos laboratorios para conocer la susceptibilidad a PZA a pesar de las limitaciones que se le atribuyen. Este método detecta actividad pirazinamidasasa (PZAasa) la cual es necesaria para que la droga ejerza su actividad bactericida contra *M. tuberculosis* (9). Dentro de las deficiencias atribuibles a este método se puede señalar que no detecta la resistencia debido a mecanismos alternativos como son los relacionados con la incorporación de la droga al interior de la célula, regulaciones del gen estructural o alteraciones en los mecanismos de eflujo.

La nicotinamida (NIC) es una droga análoga estructural de la PZA; estas drogas son convertidas por la enzima PZAasa, en sus formas ácidas activas, ácido nicotínico y POA, respectivamente. De este modo, las cepas que han perdido la actividad de esta enzima son resistentes a ambas drogas. Sin embargo, mientras que *M. tuberculosis* requiere un medio ácido para convertir la PZA en su forma activa, la NIC puede ser convertida en ácido nicotínico a un pH fisiológico (10, 11).

En los últimos años muchas investigaciones se han encaminado hacia el desarrollo de técnicas alternativas para la detección de resistencia a PZA como son el Método de la Nitrato Reductasa (MNR) y el Microensayo Verde Malaquita (MVM). El MNR detecta a través de una reacción colorimétrica el nitrito presente en el medio de cultivo como un subproducto del metabolismo de *M. tuberculosis*; por su parte, en el MVM, el indicador verde malaquita se decolora cuando se produce el crecimiento de *M. tuberculosis* (12-14).

Tomando en consideración que la PZA es convertida en su forma activa por acción de la enzima pirazinamidasasa (PZAasa) que es codificada por el gen *pncA* y que dicha enzima es además responsable de convertir la nicotinamida (NIC), en su forma activa sin requerir para esto de un pH ácido. Nos propusimos realizar la presente investigación planteándonos los siguientes objetivos:

Objetivos

- Implementar en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis del IPK (LNRTB-IPK) el Método de la Nitrato Reductasa y el Microensayo Verde Malaquita para la detección de resistencia a PZA utilizando la nicotinamida.
- Comparar los resultados obtenidos con el Ensayo Enzimático de Wayne (método de referencia).
- Secuenciar el gen *pncA* de las cepas resistentes y las que muestren resultados discordantes.

Diseño Metodológico

Cepas: Un total de 102 cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la colección del LNRTB-IPK fueron evaluadas. La cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), sensible a las drogas antituberculosas de primera línea fue utilizada como control de sensibilidad y la cepa *M. tuberculosis* (ATCC 35828) monorresistente a PZA fue empleada como control de resistencia en los métodos evaluados.

Método de la Nitrato Reductasa: Se siguió la metodología descrita en el 2002 por Ängeby *et al* (12). Para la realización del MNR se utilizó el medio LJ con las drogas añadidas antes de la coagulación conteniendo KNO_3 a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- **Preparación del inóculo:** Se preparó en PBS una suspensión bacilar con una turbidez similar al tubo 1 de la escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ células/mL). Seguidamente se tomó 1 mL de esta suspensión y se realizó una dilución 1:10 en tubos que contenían 9 mL de PBS.
- **Inoculación de los tubos:** Se inocularon 3 tubos de medio control LJ + KNO_3 con 200 μL de la dilución 1:10 de la suspensión de *M. tuberculosis* ajustada según la turbidez del tubo 1 de la escala de McFarland. Los tubos con NIC (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se inocularon con 200 μL de la suspensión bacteriana ajustada según la turbidez del tubo 1 de la escala de McFarland.
- **Incubación:** Los tubos se incubaron a 37°C en posición inclinada, de forma tal que el inóculo se distribuyera sobre toda la superficie, manteniendo las tapas ligeramente cerradas durante 24-48 horas. Pasado este tiempo, se ajustaron las tapas y se colocaron los tubos en posición vertical hasta que se realizó la lectura (7, 10 ó 14 días).
- **Revelado del ensayo:** Al séptimo día de incubación se reveló un tubo control de crecimiento, añadiéndole 500 μL de la mezcla reveladora que estuvo formada por: 1 volumen (HCl al 50%) + 2 volúmenes (sulfanilamida al 0,2%) + 2 volúmenes (N-1-naftil etilendiamina dihidroclorhidrato al 0,1%). La formación de un compuesto de color rosado indicó la viabilidad de *M. tuberculosis* y por tanto se revelaron los tubos con NIC. De lo contrario los tubos fueron reincubados y revelados pasados los días 10 ó 14 de incubación.

- Lectura e interpretación:** La cepa se consideró sensible cuando no se desarrolló color en el tubo con NIC o si el color en el tubo con droga fue más débil que en el tubo control de crecimiento. Si el color desarrollado en el tubo con NIC fue más intenso que en tubo control de crecimiento, la cepa fue definida como resistente.

Método del Verde Malaquita: Se empleó el método descrito en el año 2008 por Farnia *et al* (14). Se empleó el medio de cultivo Middlebrook 7H9 (M7H9) enriquecido con un 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa) (DIFCO Laboratories).
- Preparación del inóculo:** Se preparó una suspensión bacteriana con una turbidez similar al tubo 1 de la escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ células/mL). Luego se realizó una dilución (1:5) de la suspensión utilizando el medio M7H9 para un total de 3 mL.
- Inoculación de los viales:** Se añadieron 100 μ L de la suspensión bacteriana en 3 viales control de crecimiento y en un vial con NIC (250 μ g/mL).
- Incubación:** Los viales se incubaron a 37°C hasta el día de la lectura (7, 10 ó 14).
- Revelado del ensayo:** Al séptimo día de incubación se añadió 50 μ L de solución de verde malaquita con una concentración de 0,05 mg/mL a uno de los viales control de crecimiento y control de medio. Ambos se incubaron de 12 a 24 horas a 37°C. Al día siguiente se compararon ambos viales: si el vial control de medio permaneció del mismo color y se produjo cambio de color en el vial control de crecimiento, se procedió a revelar otro de los viales control de crecimiento y al vial con droga, adicionándoles 50 μ L de solución de verde malaquita. Posteriormente estos viales fueron incubados 24 horas para luego proceder a su lectura. Si al 7mo día de incubación no se pudo realizar la lectura por no haber pérdida de la intensidad del color en el vial control de crecimiento, se efectuó el revelado de los otros dos viales a los 10 ó 14 días de incubación.
- Lectura e Interpretación:**
 Cepa sensible: cuando no se produce cambio de color en el vial con droga.
 Cepa resistente: Si se produce disminución de la intensidad del color (que pudiera llegar a incoloro) en el vial con droga.
Ensayo enzimático de Wayne: Se empleó el método descrito por Wayne en 1974 (9) y se utilizó el medio Dubos.
- Preparación del inóculo:** Se preparó una suspensión bacilar con turbidez similar al tubo 5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^9$ células/mL).
- Inoculación de los tubos:** Se añadieron 100 μ L de la suspensión bacteriana en 3 tubos de medio Dubos. Inmediatamente se distribuyó el inóculo en toda la superficie del medio y se procedió a incubar los tubos.
- Incubación:** Los tubos se incubaron a 37°C en posición vertical manteniendo las tapas ligeramente cerradas durante 24-48 horas. Pasado este tiempo, se ajustaron las tapas hasta que se realizó la lectura (4, 7 ó 10 días).
- Revelado del ensayo:** Al cuarto día de incubación se reveló uno de los tubos, añadiendo 1 mL de sulfato de hierro amoniacal al 1%. Pasados 30 minutos se examinó la presencia de una banda rosada en el medio, de no aparecer se refrigeraron los tubos por 4 horas y se volvieron a examinar, de lo contrario se efectuó el revelado de los otros dos tubos al séptimo o al décimo día de incubación.

- **Lectura e interpretación:** La cepa se consideró sensible cuando apareció una banda rosada en la superficie que difunde en el medio, lo que indicó actividad PZAasa; de no aparecer dicha banda la cepa fue definida como resistente.

Amplificación por PCR y secuenciación automática: El ADN de las cepas de *M. tuberculosis* se obtuvo siguiendo la metodología descrita por van Soolingen *et al* (15). El gen *pncA* fue amplificado utilizando los oligonucleótidos complementarios P1: 5'-GTCGGTCATGTTTCGCGATCG-3' y P6: 5'-GCTTTGCCGAGCGCTCCA-3' descritos por Scorpio *et al* (16). Después del paso inicial de desnaturalización durante 5 min a 95°C, se aplicaron 40 ciclos: desnaturalización a 94°C por 1min; 55°C por 1 min y 72°C por 1 min. Una vez completados los ciclos, se realizó un paso de elongación final a 72°C durante 10 min. El producto de PCR amplificado mostró una talla de 720 bp; este producto se purificó usando el kit de extracción (Quiagen), y fue secuenciado utilizando un secuenciador automático modelo ABI 3130XL (Applied Biosystems) utilizando los mismos juegos de cebadores (P1 y P6). Las mutaciones en el gen *pncA* fueron determinadas mediante una comparación con la secuencia salvaje del gen utilizando la base de datos BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) o MacVector 10. Todas las mutaciones identificadas fueron observadas en las secuencias de ambas cadenas.

Análisis estadístico: Se calcularon los parámetros de sensibilidad y especificidad utilizando el programa estadístico MedCalc.

Resultados

En la tabla 1 se muestra la distribución de los resultados de acuerdo al día que se obtuvieron para cada método utilizado. Mediante el EEW los resultados estuvieron disponibles a los 4, 7 y 10 días para el 52,9%, 78,0% y el 100% de las cepas, respectivamente. Mientras que con el MNR, los resultados del 89,2% de las cepas se obtuvieron pasados los 10 días de incubación y para el 10.8% restante se requirieron 14 días de incubación. Mediante el MVM sólo el 27.4% de los resultados estuvo disponibles pasados los 10 días de incubación, la mayoría de los resultados se obtuvieron a los 14 días.

Tabla 1: Tiempo requerido para obtener los resultados de resistencia a PZA mediante el EEW, MNR y MVM.

Métodos	Días de obtención de los resultados			
	4	7	10	14
EEW	54	25	23	-
MNR	-	38	53	11
MVM	-	2	26	74

De las 16 cepas resistentes mediante el EEW, 15 mostraron igual comportamiento mediante los métodos alternativos evaluados, alcanzándose una sensibilidad del 93,75% para ambos métodos. La especificidad para el MNR y el MVM fue del 97,67%.

El 87,5% de las cepas resistentes (14/16) mostraron mutaciones en el gen *pncA*. En una cepa identificada por el MNR como falsa resistente se encontró mutaciones en el gen *pncA*.

Discusión

Tomando en consideración que la PZA es una de las drogas utilizada en la fase inicial intensiva del tratamiento antituberculoso, existe una necesidad urgente de desarrollar métodos simples, confiables y económicos para la detección de resistencia a esta droga. A pesar de la reconocida actividad *in vivo*, las pruebas de susceptibilidad *in vitro* son difíciles de realizar debido a que esta droga es activa a un pH ácido (3, 17).

Dentro de los métodos convencionales, el sistema radiométrico BACTEC-460 es considerado la técnica más confiable pero su uso está limitado a los países desarrollados mientras que, el EEW es utilizado como una alternativa en aquellos países donde los métodos de cultivo automatizados no están disponibles (7).

Hace varios años se reportó que la NIC, un análogo de la PZA, presentaba actividad antituberculosa (10, 18), que las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA también eran resistentes a NIC y que la resistencia a PZA podía determinarse de manera confiable cuando se empleaban altas concentraciones de NIC sin necesidad de acidificar el medio de cultivo (19, 20). Basado en estos reportes Martin *et al* estandarizaron el ensayo colorimétrico con resazurina (21) y el MNR (22) para determinar la resistencia a PZA utilizando la NIC. En el 2008 Farnia *et al* (14) reportaron el uso del MVM para determinar resistencia a drogas de primera y segunda línea, incluyendo a la PZA pero no reportaron el empleo de la NIC. En el presente estudio, se evaluó el MNR y el MVM para la detección de resistencia a PZA utilizando la NIC.

En comparación con el EEW, el MNR y el MVM utilizando NIC, mostraron idénticos valores de sensibilidad y especificidad, 93.75% y 97.67% respectivamente. Estos valores son similares a los reportados previamente por Martin *et al* (22) quienes alcanzaron valores de sensibilidad y especificidad del 91.0% y 94.0%, respectivamente. Sorprendentemente, la sensibilidad del MVM utilizando NIC fue superior a la reportada por Farnia *et al* (14) (75.0%), resultados que pudieron estar motivados por el escaso crecimiento micobacteriano en el medio acidificado que se requiere para lograr la actividad de la PZA.

El EEW resulta asequible por ser un método económico y habitualmente confiable pero la presencia de una banda rosada en el medio de agar Dubos convencional, la cual indica actividad PZAasa y por tanto sensibilidad a la PZA, puede ser difícil

de apreciar debido a que esta puede ser tenue y por tanto apenas perceptible (21, 23). Con vistas a lograr que sea más fácil la interpretación de los resultados y poder identificar cepas con baja actividad PZAasa, Singh *et al* (23) recomendaron extender hasta 10 días la incubación de las cepas que resulten negativas a los 4 y 7 días. En nuestro trabajo tuvimos en cuenta este criterio y en 23 cepas fue necesario esperar 10 días para poder visualizar la banda rosada que indica actividad PZAasa; si la lectura final la hubiésemos realizado a los 7 días, estas cepas hubieran sido erróneamente clasificadas como resistentes a PZA y por tanto la sensibilidad del MNR y MVM hubiese sido mucho menor.

Los resultados alcanzados fueron confirmados mediante la secuenciación del gen *pncA* encontrándose que el 87,5% de las cepas resistentes (14/16) mostraron mutaciones en el gen *pncA* lo que confirma que la pérdida de la actividad PZAasa constituye el principal mecanismo de resistencia a PZA; en las dos cepas resistentes en las cuales no aparecieron mutaciones en el gen *pncA*, la resistencia pudiera deberse a una actividad de la enzima PZAasa por debajo de los límites de detección de los métodos utilizados o la presencia de otros mecanismos de resistencia como son la presencia de mutaciones en la diana de la droga o alteraciones en el mecanismo de transporte de la PZA.

Hubo una cepa que fue reportada como resistente por el EEW y a su vez presentó mutaciones en el gen *pncA* sin embargo, fue sensible mediante el MNR y MVM lo que podría sugerir que estos métodos son más sensibles que el EEW en detectar una actividad PZAasa baja. Sin embargo, este hallazgo no justifica porque a su vez estos métodos fallaron en determinar actividad PZAasa en otras dos cepas que el EEW identificó como sensible. Por otra parte, en una cepa identificada por el MNR como falsa resistente se encontró mutaciones en el gen *pncA*. Tomando en consideración los hallazgos encontrados, se hacen necesarios estudios adicionales para evaluar el papel de la estructura – función de cada una de las sustituciones aminoacídicas en la actividad de la enzima PZAasa.

En cuanto a los costos de aplicación del MNR y MVM, estudios previos al nuestro reportan que una determinación de resistencia mediante el MNR para dos drogas antituberculosas tiene un valor de 3.00 USD por cada aislamiento, lo que es mucho más económico que la determinación mediante el sistema radiométrico BACTEC-460 y MGIT manual que implica un gasto de 21.00 USD y 23.00 USD, respectivamente (24). Los gastos que se han reportado para el MVM son de 2.50 USD para determinar resistencia a 12 drogas frente a un aislamiento clínico (14).

Conclusiones

- El presente trabajo constituye el primer reporte científico internacional que evalúa y demuestra la alta confiabilidad de dos métodos colorimétricos que utilizan la nicotinamida para la detección de resistencia a pirazinamida en *M. tuberculosis*.

- Por primera vez el LNRTB-IPK dispone de resultados de secuenciación de uno de los genes involucrados con la resistencia de *M. tuberculosis*, lo que confirma la utilidad de los métodos estudiados.
- Por la sencillez de los métodos aplicados y no requerir el empleo de equipos sofisticados se recomienda la implementación de los mismos en Laboratorios de Referencia de países de bajos recursos.
- El disponer de métodos confiables para la detección de resistencia a pirazinamida permitirá conocer las cifras de resistencia a esta droga y a su vez contribuir al cambio oportuno del esquema de tratamiento en pacientes portadores de cepas resistentes, contribuyendo a disminuir la transmisión de la enfermedad en la comunidad.

Referencias Bibliográficas

1. Global tuberculosis control: WHO report 2010. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2010.7).
2. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21:299–308.
3. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J Bacteriol 1999. 181:2044–9.
4. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis 2003;7:6–21.
5. Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol 2005;45:529–64.
6. Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Front Biosci 2004;9:975–94.
7. Kruuner A, Yates M D, Drobniowski F A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006;44:811–8.
8. Siddiqui, S. 2004. BACTEC 460TB system-indirect susceptibility tests with pyrazinamide for *Mycobacterium tuberculosis*, p. 7.8.2.1–7.8.2.3. In H. D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed., vol. 2. ASM Press, Washington, DC.
9. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1974;109:147–51.
10. McKenzie D, Malone L, Kushner S. The effect of nicotinic acid amide on experimental tuberculosis of white mice. J Lab Clin Med 1948;33: 1249–53.
11. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 1996;2:662–7.
12. Ångeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol 2002;40:553-5.

13. Lemus D, Montoro E, Echemendía M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in ***Mycobacterium tuberculosis***: simple and inexpensive method for low-resource laboratories. *J Med Microbiol* 2006;55:861–3.
14. Farnia P, Reza M, Mohammadi F, Tabarsei P, Farnia P, Mohammadzadeh AR, *et al.* Colorimetric detection of multidrug-resistant or extensively drug-resistant tuberculosis by use of malachite green indicator dye. *J Clin Microbiol* 2008;46:796–9.
15. van Soolingen D, Hermans P W M, de Hass P E W, Soll D R, van Embden J D A. Occurrence and stability of insertion sequences in ***Mycobacterium tuberculosis*** complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2578–86.
16. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, *et al.* Characterization of *pncA* mutations in PZA-resistant ***Mycobacterium tuberculosis***. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:540–3.
17. Heifets L. Susceptibility testing of ***Mycobacterium tuberculosis*** to PZA. *J Med Microbiol* 2002;51:11–2.
18. McDermott W, Tompsett R. Activation of PZA and nicotinamide in acidic environment *in vitro*. *Am Rev Tuberc* 1954;70:748–54.
19. Brander E. A simple way of detecting PZA resistance. *Tubercle* 1972;53:128–31.
20. Kalich R, Gerloff W, Neubert R, Ulber H. Determination of the sensitivity of mycobacteria to pyrazinamide and nicotinamide. *Z Erkr Atmungsorgane* 1978;151:103–12.
21. Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino J C, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in ***Mycobacterium tuberculosis*** using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:327–31.
22. Martin A, Cubillos-Ruiz A, Von Groll A, Del Portillo P, Portaels F, Palomino J C. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in ***Mycobacterium tuberculosis*** using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:123–7.
23. Singh P, Wesley C, Jadaun G P S, Malonia S K, Das R, Upadhyay P, *et al.* Comparative evaluation of Löwenstein-Jensen proportion method, BacT/ALERT 3D system, and enzymatic pyrazinamidase assay for pyrazinamide susceptibility testing of ***Mycobacterium tuberculosis***. *J Clin Microbiol* 2007;45:76–80.
24. Syre H, Phyu S, Sandven P, Bjorvatn B, Grewal H M S. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of ***Mycobacterium tuberculosis*** to isoniazid and rifampin in liquid cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:5173–7.