

# TESTAREA SENSIBILITĂȚII MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PRIN METODA NITRAT-REDUCTAZEI

## *Mycobacterium tuberculosis sensibility testing through nitroreductase method*

Dr. Violeta Melinte, Dr. Maria Nica, Dr. Tatiana Biolan, Dr. Amalia Dascălu  
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș“

### REZUMAT

**Introducere:** Antibiograma pentru *Mycobacterium tuberculosis* este solicitată în special în caz de recădere sau rezistență multidrog (MDR). Metodele de cultivare in vitro și testare a sensibilității la agenții antituberculoși sunt laborioase și nu sunt disponibile în orice laborator de bacteriologie. Metoda nitrat-reductazei (NRA) – simplă și ieftină - a fost comparată cu metoda standard a proporțiilor în determinarea antibiogramelor *M. tuberculosis*, în scopul evaluării eficienței și utilității acesteia ca metodă de screening, în laboratoarele spitalelor de pneumoftiziologie.

**Materiale și metodă:** Antibiogramele au fost efectuate pentru 105 probe de spută prin NRA directă și pentru 34 culturi proaspete de *Mycobacterium tuberculosis* prin NRA indirectă și metoda proporțiilor, utilizând o concentrație de 0,2 μg izoniazidă (HIN), respectiv 40μg rifampicină (RPM).

**Rezultate:** Sensibilitatea și specificitatea înregistrate prin NRA directă au fost de 75% și 100% pentru rifampicină, respectiv 75% și 98,4% pentru izoniazidă. Sensibilitatea și specificitatea metodei indirecte au fost de 77,7% și 92% pentru rifampicină, respectiv 85,7% și 85,2% pentru izoniazidă.

**Concluzii:** Testarea sensibilității *M. tuberculosis* prin metoda NRA este simplă, cu rezultate rapide în 10-14 zile, față de 42 zile prin metoda proporțiilor. Utilizarea directă a sputelor bacili acid-alcoolo-rezistenți (BAAR) pozitive este reproductibilă și mai rapidă cu 3-8 săptămâni necesare pentru izolarea *M. tuberculosis*.

**Cuvinte cheie:** Mycobacterium tuberculosis, antibiogramă, metoda nitrat-reductazei

### ABSTRACT

**Background:** Drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* is especially required in difficult cases of tuberculosis chemotherapy and in cases of multidrug resistance (MDR). The methods for in vitro cultivation and drug susceptibility testing (DST) of *M. tuberculosis* are cumbersome and not readily adaptable in most routine laboratories. A simple and cost effective method, the nitrate reductase assay (NRA), was compared with the gold standard proportion method for DST of *M. tuberculosis* in order to substantiate its suitability as screening method in tuberculosis hospitals.

**Method:** Drug susceptibility test was performed for 105 sputum specimens (direct DST) and 34 pulmonary isolates of *M. tuberculosis* (Indirect DST) by the NRA and the proportion method using 0.2μg izoniazid (HIN), 40 μg rifampicin (RPM).

**Results:** The sensitivity and specificity of direct NRA for RMP was 75% and 100%, but for HIN was 75%, and 98,4% respectively. The indirect NRA showed sensitivity and specificity for HIN: 85,7% and 85,2%, and for RMP: 77,7% and 92% respectively.

**Conclusion:** Drug susceptibility test of *M. tuberculosis* by the NRA is simple and sensitive with shorter turn around time of 10 to 14 days compared to 42 days by the proportion method. The direct use of acid fast bacilli (AFB) positive sputum specimens is likewise reproducible and excludes about 3 – 8 weeks period required for isolation of *M. tuberculosis*.

**Key words:** Mycobacterium tuberculosis, drug susceptibility test, nitratereductase assay

## INTRODUCERE

În ultimele decenii, rezistența multi-drog (MDR) a devenit o amenințare importantă în controlul terapeutic al tuberculozei (TB) (1). Detectarea rapidă a rezistenței la rifampicină, marker decisiv al rezistenței multidrog, conferă o mare utilitate clinică, în măsura în care poate identifica pacienții care nu răspund la terapie, ceea ce ar putea contribui la reducerea transmisiei bolii. Dezvoltarea unei metode alternative, rapide și ieftine, care se poate aplica direct probelor biologice de spută, este benefică pentru Programele Naționale de Control al Tuberculozei, conferind o monitorizare rapidă a pacienților pasibili de TB-MDR (2).

Testele convenționale utilizate pentru detectarea sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la antibiotice, sunt laborioase și cronofage. Sistemele automate oferă rezultate rapide, dar sunt costisitoare și imposibil de aplicat în țările mai puțin dezvoltate (3).

Metoda cu nitrat-reductază (NRA), aplicație a metodei Griess (4), a fost utilizată în ultimul deceniu pentru evaluarea sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la antibiotice, folosind mediul Löwenstein-Jensen (5-9). Metoda se bazează pe capacitatea *Mycobacterium tuberculosis* de a reduce nitratul la nitrit, prin acțiunea enzimei nitrat-reductază, reacție semnalată prin virajul de culoare după adăugarea reactivului Griess. NRA permite detectarea rapidă a creșterii micobacteriilor.

Obiectivul acestui studiu a fost evaluarea performanței metodei directe și indirecte cu nitrat-reductază față de metoda clasică a proporțiilor, în determinarea sensibilității la rifampicină și izoniazidă. Metoda directă a fost aplicată direct pe probele de spută provenite de la pacienți cu tuberculoză, în timp ce metoda indirectă a fost aplicată pe tulpinile izolate de *Mycobacterium tuberculosis*.

## MATERIALE ȘI METODĂ

În intervalul iunie 2009 – iunie 2010, în laboratorul Spitalului de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș” au fost prelucrate un număr de 139 probe biologice, dintre care 105 probe de spută și 33 tulpini izolate, de la 122 pacienți diagnosticați cu tuberculoză pulmonară. Au fost selectate probe biologice (spută) cu peste 10 BAAR/100 câmpuri (BAAR 1+). Antibiogramele rezultate prin metoda clasică, a proporțiilor, au fost comparate cu cele rezultate prin metoda directă și indirectă bazată pe activitatea nitrat-reductazei.

## Metoda directă de testare a rezistenței

### *M. tuberculosis* prin metoda nitrat-reductazei

Metoda a fost descrisă anterior de Musa et al (10), dar cu modificarea compoziției reactivului Griess (acid acetic 286g/l, acid sulfanilic 1,55g/l, Naphthylamina 0,31g/l), manufacturat de Merk KGaA. Am folosit mediu Löwenstein-Jensen cu 1000mg nitrat de potasiu (KNO<sub>3</sub>)/ ml, cu și fără antibiotic, furnizat de S.C. Sanimed International Impex S.R.L. Pentru mediul cu rifampicină (RPM) concentrația critică a fost de 40 μg/ml, iar pentru cel cu izoniazidă (HIN) concentrația critică a fost de 0,2 μg/ml.

Din sedimentul suspendat am inoculat câte 0,2 ml pe cele 3 tuburi cu medii martor (Löwenstein-Jensen cu nitrat de potasiu, fără antibiotic), iar cantitatea rămasă am diluat-o cu apă distilată 1:10, și ulterior am inoculat câte 0,2 ml din diluție pe cele 2 tuburi cu mediu Löwenstein-Jensen cu nitrat și antibiotic, RPM, respectiv HIN.

După 10 zile de incubare la 37°C, am adăugat 0,2 ml reactiv Griess în primul tub cu mediu martor. Dacă s-a observat virajul de culoare spre roz-violet, am adăugat câte 0,2 ml de reactiv și în tuburile cu antibiotic. Dacă nu au fost semnalate modificări de culoare pentru tubul martor, s-a repetat procedura la 14 zile, și la 18 zile.

Rezultatele au fost considerate pozitive dacă s-a semnalat virajul de culoare de la roz pal (±) la violet (5+), sau negativ dacă nu a existat nici o modificare de culoare. Izolatul a fost considerat rezistent în condițiile în care virajul de culoare din tubul cu antibiotic a fost mai accentuat decât cel din tubul martor. Izolatul a fost considerat sensibil la antibiotice, dacă virajul de culoare a fost absent sau mai slab decât cel din tubul martor.

## Metoda indirectă de testare a rezistenței

### *M. tuberculosis* prin testul nitrat-reductazei

Metoda a a fost descrisă anterior de Angeby et al. (11), dar cu mențiunea ca a fost ajustată concentrația critică a HIN. Am utilizat aceleași serii de tuburi cu mediu Löwenstein-Jensen cu nitrat de potasiu, cu și fără antibiotice. Am prelevat 2 anse din cultura proaspătă de *Mycobacterium tuberculosis*, pe care am suspendat-o în soluție tampon, apoi am centrifugat-o pentru a obține o turbiditate de McFarland standard numărul 1. Din această suspensie am inoculat câte 0,2 ml în cele 3 tuburi martor, iar din restul suspensiei am preparat o diluție 1:10 cu apă distilată. Am inoculat câte 0,2 ml din diluția 1:10 în tuburile cu antibiotic. Tuburile au fost ulterior incubate la 37°C.

După 7 zile, am adăugat câte 0,2 ml reactiv Griess în primul tub cu mediu martor. Dacă s-a observat virajul de culoare spre roz-violet, am adăugat câte 0,2 ml de reactiv și în tuburile cu antibiotic. Dacă nu au fost semnalate modificări de culoare, s-a repetat procedura la 10 zile, și la 14 zile. Izolatul a fost considerat rezistent în condițiile în care virajul de culoare din tubul cu antibiotic a fost mai intens decât cel din tubul martor. Izolatul a fost considerat sensibil la antibiotice, dacă virajul de culoare a fost absent sau mai slab decât cel din tubul martor.

Analiza statistică a datelor s-a efectuat aplicând testul Mc Nemar. Performanța metodei NRA față de metoda proporțiilor a fost evaluată prin sensibilitate (capacitatea de a detecta adevărata rezistență) și specificitate (abilitatea de a determina adevărata sensibilitate). Valoarea predictivă pozitivă a metodei (VPP) reprezintă probabilitatea de a fi rezistent, când testul este pozitiv. Valoarea predictivă negativă (VPN) reprezintă probabilitatea de a nu fi rezistent când testul este negativ.

Concordanța dintre cele 2 metode a fost estimată prin valoarea Kappa, și interpretată astfel: < 0,2 slabă; 0,2 – 0,4 ușoară; 0,4 – 0,6 moderată; 0,6 – 0,8 bună; > 0,8 excelentă.

## REZULTATE

Am utilizat 139 probe biologice, dintre care 105 probe de spută și 34 culturi proaspete de *Mycobacterium tuberculosis*, de la 122 pacienți.

Cele 105 probe de spută au constatat în 31 probe BAAR 3+, 22 probe BAAR 2+, 50 probe BAAR 1+. Din cele 105 probe de spută supuse metodei NRA directe de determinare a antibiogrammei, 35 nu au furnizat nici un rezultat până la 18 zile. 2 spute au fost contaminate, 21 au fost BAAR 1+, 6 au fost BAAR 2+, și 6 BAAR 3+. Din cele 33 spute necontaminate, 8 au condus la izolarea și identificarea de tulpini de *Mycobacterium tuberculosis*, ceea ce demonstrează existența de tulpini (24,2%) nitrat-reductază negative.

Din cele 103 probe de spută necontaminate 70 (68%) au conferit rezultate până la 18 zile de la recoltare: 25 BAAR 3+, 16 BAAR 2+, 29 BAAR 1+.

Rezultatele pentru cele 70 de spute au fost obținute la 10 zile pentru 22 de probe, la 14 zile pentru 26 probe și la 18 zile pentru 22 probe. S-a constatat că la 10 zile s-au obținut rezultate de la 11 probe BAAR 3+, la 14 zile s-au obținut rezultate de la 11 probe BAAR 2+, iar la 18 zile s-au obținut rezultate de la 8 probe BAAR 1+ (figura 1).

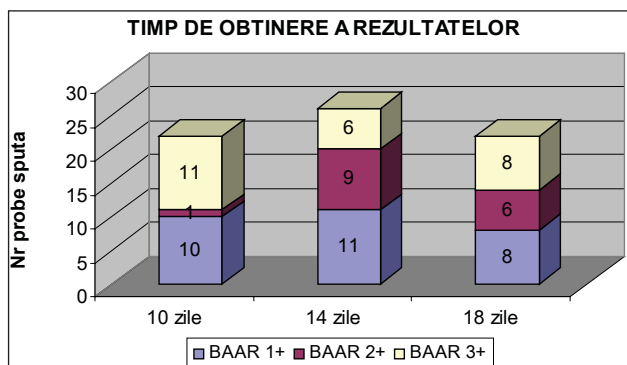


FIGURA 1. Dispoziția rezultatelor în perioadele de așteptare

Comparația metodei NRA directă cu metoda proporțiilor (MP) a arătat discrepanță pentru 2 probe, care au fost sensibile prin NRA, dar rezistente prin MP la rifampicină (tabelul 1). La izoniazidă au fost semnalate alte 2 rezultate discordante între cele 2 metode (tabelul 1). Sensibilitatea înregistrată a fost de 75% atât pentru rifampicină, cât și pentru izoniazidă, în timp ce specificitatea a fost mai mare pentru rifampicină (100%), față de 98,4% pentru izoniazidă.

Pentru cele 34 de tulpini obținute din culturi s-a aplicat NRA indirectă pentru determinarea antibiogrammei la rifampicină și izoniazidă. Au fost semnalate 4, respectiv 5 rezultate discordante pentru RMP, respectiv HIN. Sensibilitatea a fost mai mare pentru NRA directă, dar specificitatea mai mică (tabelul 2).

TABELUL 1. Rezistența la RMP și HIN, determinată prin NRA directă și MP

Tuberculostatic	NRA	Rezultate obținute prin MP		%				Kappa
		R	S	Sensibilitate	Specificitate	VPP	VPN	
RMP	R	6	0	75	100	100	96,8	0,83
	S	2	62					
HIN	R	3	1	75	98,4	75	98,4	0,73
	S	1	65					

TABELUL 2. Rezistența la RMP și HIN, determinată prin NRA indirectă și MP

Tuberculostatic	NRA	Rezultate obținute prin MP		%				Kappa
		R	S	Sensibilitate	Specificitate	VPP	VPN	
RMP	R	7	2	77,7	92	77,7	92	0,70
	S	2	23					
HIN	R	6	4	85,7	85,2	60	95,8	0,61
	S	1	23					

Din cele 34 probe, la 7 zile s-au pozitivat 25, la 10 zile s-au pozitivat 7, iar la 14 zile 2 probe. Majoritatea probelor au oferit rezultate la 7 zile de la obținerea culturii pozitive (figura 2).

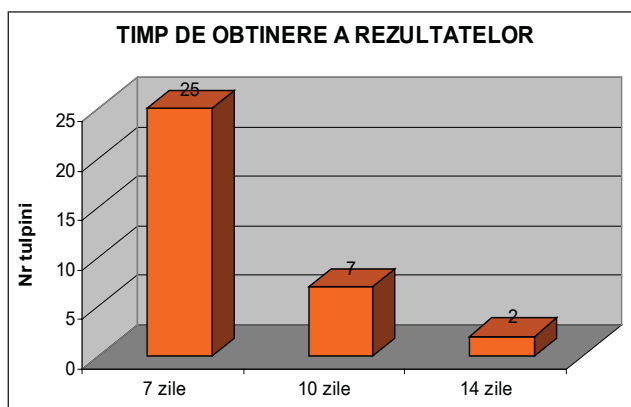


FIGURA 2. Diagrama rezultatelor obținute prin NRA indirectă

## DISCUȚII

Din experiența noastră, metoda NRA directă sau indirectă de testare a sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la antibiotice, este simplă și reproductibilă. În cazul nostru 32% din probele biologice au condus la rezultate invalide. 8/33 probe (24,2%) au condus la izolarea de tulpini *M. tuberculosis* nitrat-reductază negative. Unele studii conduse în Africa au pus în evidență o frecvență înaltă de tulpini *M. tuberculosis* nitrat-reductază negative (12, 13). Alte studii au evidențiat o frecvență scăzută de astfel de tulpini (14). Aceste cazuri necesită alte metode de determinare a rezistenței bacteriene, decât NRA.

NRA este ieftină, simplu de aplicat și nu necesită echipament special. Dezavantajele biosecurității sunt depășite prin utilizarea de mediu solid.

În condițiile în care NRA are ca principiu semnalarea creșterii bacteriene prin reducerea nitratului, rezultatele sunt obținute înainte de perceperea macroscopică a prezenței coloniilor. În studiul nostru, 68% dintre probele biologice au oferit rezultate până la 18 zile, față de metodele indirecte care necesită 21-28 zile până la izolarea tulpinii, ulterior alte 28-48 zile pentru antibiogramă. Timpul necesar obținerii antibiogrammei este astfel scurtat de la peste 40 de zile prin metode clasice, la 14-18 zile (10).

NRA poate fi testat și pe probele de spută slab pozitive în microscopie: BAAR 1+ și BAAR 2+, tulpini care în studiul nostru au reprezentat 64,3% din probe.

S-a obținut o concordanță excelentă pentru rifampicină și bună pentru izoniazidă între MP și NRA directă. Dintre cele 8 tulpini rezistente la rifampicină prin MP, 2 au fost sensibile prin NRA. De aceea sensibilitatea testului pentru RMP a fost de numai 75%.

Cele 2 probe care au arătat discordanță au fost BAAR 1+. Solis et al., care a testat de asemenea probe biologice slab pozitive în microscopia optică (15), au evidențiat specimene fals sensibile prin NRA, spre deosebire de studiul condus de Musa et al. pe probe BAAR 3+, care nu au evidențiat nici un rezultat discordant. Aplicarea metodei pe spute BAAR 2+ a condus la rezultate tardive (peste 18 zile) pentru majoritatea probelor (10). Pentru aceste specimene slab pozitive sunt necesare noi studii care să optimizeze metoda NRA directă de determinare a antibiogrammei. Este posibil ca un mediu lichid să reducă timpul de așteptare a rezultatelor pentru aceste probe (16).

Rezultatele experienței pentru rezistența la RIF sunt comparabile cu cele obținute anterior de Affolabi et al. (2). Sensibilitatea și specificitatea înregistrate prin NRA directă au fost de 75% și 100% pentru Rifampicină, respectiv 75% și 98,4% pentru izoniazidă. Prin metoda NRA indirectă, majoritatea rezultatelor noastre s-a obținut la 7 zile de la izolarea tulpinilor, mult mai rapid decât MP care durează 3-4 săptămâni, rezultate comparabile cu cele obținute în studii anterioare (11, 6, 7, 17).

Rezultate obținute la 5 zile de la izolarea culturii au fost posibile atunci când metoda a fost aplicată pe mediu lichid (2). Sensibilitatea și specificitatea metodei indirecte au fost de 77,7% și 92% pentru rifampicină, respectiv 85,7% și 85,2% pentru izoniazidă, ușor inferioare rezultatelor obținute de Ani et al. (18). În general, studiile anterioare au demonstrat concordanță bună sau excelentă între NRA indirectă și metodele clasice, pentru cele 2 antibiotice. Având în vedere că metoda este ieftină, rapidă, reproductibilă, iar rifampicina și izoniazida sunt antibiotice antituberculoase de primă linie, NRA ar putea fi utilizată pentru screeningul rezistenței la aceste substanțe, putând furniza rezultate rapide în ceea ce privește prevalența tulpinilor MDR.

Luând în considerație avantajele metodei, sunt necesare studii ulterioare care să aprecieze acuratețea și aplicabilitatea metodei, în condițiile în care nitratul de potasiu – adjuvant pentru mediul standard, și reactivul Griess – sunt materiale ieftine și sigure. NRA are potențialul de a deveni o alternativă ieftină pentru determinarea rezistenței *M. tuberculosis*, mai ales la RMP și HIN, antibiotice antituberculoase de primă linie. Ar putea fi utilizată

ca metodă screening, combinată sau nu cu alte metode. În viitor, metoda ar putea îmbunătăți performanțele programelor de control al tuberculozei, în special în țările endemice.

## CONCLUZII

- Metoda NRA directă sau indirectă de testare a sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la antibiotice este simplă, reproductibilă și ieftină.
- Unul dintre dezavantajele metodei NRA directă este rata mare de eșec (32%).
- 8/33 probe (24,2%) au condus la izolarea de tulpini *M. tuberculosis* nitrat-reductază negative.
- 68% dintre probele biologice au oferit rezultate până la 18 zile de la recoltarea probei, prin NRA directă.
- Rata maximă de pozitivare a fost la 14 zile (37%), pentru celelalte două intervale fiind echivalentă (31%).
- Rezultatele consemnate au provenit în măsură mai mare de la probe BAAR 3+ (80%), decât de la probe BAAR 1+ (58%).

- NRA directă poate fi testată și pe probele de spută slab pozitive în microscopie: BAAR 1+ și BAAR 2+, tulpini care în studiul nostru au reprezentat 64,3% din probe.
- S-a obținut o concordanță excelentă pentru rifampicină și bună pentru izoniazidă între MP și NRA directă.
- Probele biologice slab pozitive în microscopia optică au evidențiat rezultate fals sensibile prin NRA.
- Sensibilitatea și specificitatea înregistrate prin NRA directă au fost de 75% și 100% pentru rifampicină, respectiv 75% și 98,4% pentru izoniazidă.
- NRA indirectă are avantajul rezultatelor în 100% din cazuri, dar dezavantajul timpului de așteptare.
- Majoritatea rezultatelor (25/34) obținute prin metoda indirectă au fost disponibile la 7 zile de la izolarea culturii.
- Sensibilitatea și specificitatea metodei indirecte au fost de 77,7% și 92% pentru rifampicină, respectiv 85,7% și 85,2% pentru izoniazidă.

## BIBLIOGRAFIE

1. **World Health Organization** – The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Antituberculosis drug resistance in the world, report no. 3. WHO/HTM/TB/2005.349. Geneva, Switzerland: WHO, 2004.
2. **Affolabi D, Odoun M, Martin A, Palomino J C, Anagonou S, Portaels F** – Evaluation of direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance by a nitrate reductase assay applied to sputum samples in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2123–2125.
3. **Giampaglia CMS, Martins MC, Vieira GBO, et al** – Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 986–991.
4. **Griess JP, Bemerkungen ZAHH** – Über einige Azoverbindungen. *Ber Deutch Chem Ges* 1879; 12: 426–428.
5. **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: 553–555.
6. **Coban AY, Birinci A, Ekinci B, Durupinar B** – Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 304–306.
7. **Lemus D, Martin A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC** – Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 130–133.
8. **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.
9. **Martin A, Montoro E, Lemus D, et al** – Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 145–150.
10. **Musa, H. R., M. Ambroggi, A. Souto, and K. A. Angeby** – Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy-positive sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 43:3159–3561. 2005.
11. **Angeby, K.A., L. Klintz, and S.E. Hoffner** – Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *J. Clin. Microbiol.* 40:553–555. 2002.
12. **Hoffner, S.E., S.B. Svenson, R. Norberg, F. Dias, S. Ghebremichael, and G.Kallenius** – Biochemical heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* 31:2215–2217. 1993.
13. **Kallenius, G., T. Koivula, S. Ghebremichael, S.E. Hoffner, R. Norberg, E. Svensson, F. Dias, B.I. Marklund, and S.B. Svenson** – Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* 1999. complex in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* 37:3872–3878.
14. **Martin, A., J.C. Palomino, and F. Portaels** – Rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J. Clin. Microbiol.* 43:1612–1616, 2005.
15. **Solis, L. A., S.S. Shin, L.L. Han, F. Llanos, M. Stowell, and A. Sloutsky** – Validation of a rapid method for detection of *M. tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9:760–764, 2005.
16. **Syre, H., S. Phyu, P. Sandven, B. Bjorvatn, and H. M. S. Grewal** – Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid Culture. *J. Clin. Microbiol.* 41:5173–5177, 2003.
17. **Sethi, S., S. Sharma, S. K. Sharma, S.K. Meharwal, S.K. Jindal, and M. Sharma** – Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to primary antitubercular drugs by nitrate reductase assay. *Indian J. Med. Res.* 120:468–471, 2004.
18. **Ani, A.E., Y.B. Dalyop, O. Agbaji, J. Idoko** – Drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* by nitrate reductase assay. *J Infect Developing Countries;* 3(1):16-19, 2009.