

Prezent și perspective în diagnosticul rapid molecular al tuberculozei și al MDR-TB (prima parte)

Mihaela Tănăsescu¹,
Cristian Didilescu²,
Constantin Marica³

1. Institutul de Pneumologie
„Marius Nasta”, București;
2. Universitatea de Medicină
și Farmacie Craiova;
3. Universitatea de Medicină
și Farmacie „Carol Davila”,
București

Dr. Mihaela Tănăsescu
Institutul de Pneumologie
„Marius Nasta”
Șos. Viilor 90, sector 5, București
e-mail: mihaeleta@yahoo.co.nz

Abstract

Present and expectations for rapid molecular diagnosis of TB and MDR-TB

Tuberculosis is still one of the diseases with a major medical and social impact, and in terms of early diagnosis (which would imply a fair treatment and established at the time), difficulties related to the delay bacilli isolation in culture, decreased susceptibility testing methods to antituberculosis drugs, lack of methods for differentiation of *M. Tuberculosis* complex germs of non TB *Mycobacteria*, may have important clinical implications. Traditional testing of anti-TB drug susceptibility on solid Löwenstein-Jensen medium (gold standard) or liquid media can only be performed using grown samples. Determining the time it takes up to 42 days on solid media and 12 days for liquid media. For MDR / XDR TB cases is absolutely essential to reduce the detection time. In these cases prove their usefulness rapid diagnostic methods. Automatic testing in liquid medium, molecular hybridization methods are currently recommended by the current WHO guidelines. Rapid diagnosis of MDR-TB is extremely useful for the early establishment of an effective treatment tailored more accurately on the spectrum of sensitivity of the resistant strain (thus reducing the risk of developing additional resistance to other drugs) and control the spread of these strains. Genetic diagnostic methods, approved and recommended by the WHO, can reduce the time of diagnosis of TB case and, importantly, the case of MDR TB. They do not replace the current standard diagnostic methods and resistance profile, but complete them in selected cases.

Keywords: tuberculosis, MDR-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, molecular diagnosis

Rezumat

Tuberculoza este încă una dintre afecțiunile cu un important impact medical și social, iar din perspectiva diagnosticului precoce (ce ar implica un tratament corect și instituit la timp), dificultățile legate de întârzierea izolării bacililor în cultură, sensibilitatea scăzută a metodelor de testare la drogurile antituberculoase, lipsa metodelor de diferențiere a germenilor aparținând complexului *M. Tuberculosis* de micobacteriile non-TB pot avea implicații importante în clinică. Testarea tradițională a sensibilității la droguri anti-TB pe mediul solid Löwenstein-Jensen (standardul de aur) sau pe medii lichide poate fi efectuată numai prin utilizarea de eșantioane cultivate. Timpul de determinare durează până la 42 de zile pe medii solide și la 12 zile pe medii lichide. Pentru cazurile de MDR/XDR TB este absolut esențială reducerea timpului de detectare. În aceste cazuri își dovedesc utilitatea metodele rapide de diagnostic. Testarea în sisteme automate în mediul lichid și metodele moleculare de hibridizare liniară sunt în prezent recomandate de ghidurile OMS actuale. Diagnosticul rapid al cazurilor de MDR-TB este extrem de util pentru instituirea precoce a unui tratament eficient, adaptat cât mai fidel spectrului de sensibilitate al tulpinii rezistente (reducând astfel și riscul de dezvoltare a rezistenței suplimentare la alte droguri) și în controlul răspândirii acestor tulpini. Metodele genetice de diagnostic, aprobate și recomandate de OMS, pot reduce timpul de diagnostic al cazului de TB și, foarte important, al cazului de MDR-TB. Nu înlocuiesc metodele actuale standardizate de diagnostic și al profilului de rezistență, dar le completează în cazuri selecționate. **Cuvinte-cheie:** tuberculoză, MDR-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnostic molecular

În fiecare an, mai mult de 1,5 milioane de oameni mor din cauza tuberculozei și aproape 9 milioane de oameni se îmbolnăvesc, devenind surse de contagiozitate⁴⁴. Această situație a fost amplificată la nivel mondial de epidemia de HIV/SIDA, persoanele contaminate cu HIV fiind de până la 50 de ori mai susceptibile de a dezvolta TB decât cele HIV-negativ^{27,44}.

Se estimează că aproape o jumătate de milion de oameni pe an dezvoltă MDR-TB, formă de boală dificil de tratat și cu șanse de vindecare mult mai reduse^{3,26,44}.

Lipsa unui diagnostic rapid și fiabil de laborator este o barieră importantă în obținerea unui răspuns eficient în detectarea precoce și tratamentul adecvat al MDR-TB.

OMS estimează că mai puțin de 12% din cazurile estimate de pacienți MDR-TB sunt detectate și doar 2% primesc tratament adecvat⁴⁴. Raportul Global al OMS (Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 GLOBAL REPORT ON SURVEILLANCE AND RESPONSE) aprecia costul tratamentului cazurilor de MDR-TB ca fiind de 50–200 ori mai mare decât tratamentul clasic al cazurilor cu chimiosensibilitate (cifra fiind dată atât de costul medica- mentelor, cât și al îngrijirii acestor cazuri, ce necesită o atenție deosebită).

Implicații importante în diagnosticul de laborator al tuberculozei chimiorezistente pot avea: întârzierea izolării bacililor în cultură, sensibilitatea scăzută a metodelor

Tabelul I Mutațiile genice implicate în rezistența la tuberculostatice

Medicament	Țintă	Gena
Isoniazidă	Enzima catalază-peroxidază	katG
Isoniazidă-ethionamidă	Sinteza de acid micolic	inhA
Rifampicină	RNA polymeraza	rpoB
Streptomicină	proteina ribozomală S12 16S rRNA	rpsL rrs
Quinolone	DNA gyraza	gyrA, gyrB

sursa: British Medical Bulletin, Volume 73-74, Issue 1, May 2005

de testare la drogurile antituberculoase, lipsa metodelor de diferențiere a germenilor aparținând complexului *M. Tuberculosis* de micobacteriile non-TB (NTM).

Rezistența la diverse medicamente anti-TB este cauzată de diverse mutații în regiuni relativ restrânse ale genomului micobacterian^{4,25}. Mutații asociate cu rezistența la medicamente apar la nivelul genei *rpoB* pentru rifampicină, genei *katG* și regiunii promotor al *mabA(fabG1)-inhA* pentru izoniazidă, *embB* pentru etambutol, *pncA* pentru pirazinamidă, *rpsL* și *rrs* pentru streptomicină și *gyrA/gyrB* pentru fluoro-chinolone^{5,34,37}.

Antibiograma fenotipică presupune cultivarea *M.tuberculosis* în prezența substanțelor anti-TB pentru a detecta creșterea (care indică rezistența) sau inhibarea creșterii (care indică sensibilitate). Testarea se poate face direct, folosind produsul patologic (spută) cu rezultat pozitiv la examenul microscopic, sau indirect, folosind ca inocul cultura crescută pe mediul solid sau lichid.

Testarea tradițională a sensibilității la droguri anti-TB pe mediul solid Löwenstein-Jensen (standardul de aur) sau pe medii lichide (ex.: Middlebrook 7H9) poate fi efectuată numai prin utilizarea de eșantioane cultivate. Timpul de determinare durează până la 42 de zile pe medii solide și 12 zile pe medii lichide. Pentru cazurile de MDR/XDR-TB este absolut esențială reducerea timpului de detectare^{3,15,26,36}. În aceste cazuri își dovedesc utilitatea metodele rapide de diagnostic.

Testarea în sisteme automate în mediul lichid și metodele moleculare de hibridizare liniară sunt în prezent recomandate de ghidurile OMS actuale^{43,44}. De aceea, devine absolut necesară existența unor laboratoare dotate din punct de vedere tehnic și cu personal instruit pentru toate testele de diagnostic (examen microscopic, cultură și teste de sensibilitate/ rezistență fenotipică sau genetică)^{7,14,36}.

Metode rapide de cultură

a) Metodele automate de cultură

BACTEC TB-460

Un progres important în diagnosticul tuberculozei a fost inovația monitorizării semiautomate a creșterii germenilor în medii lichide prin dozarea radiometrică a CO₂ produs de metabolismul bacterian.

Sistemul Bactec TB-460 a fost primul și pentru mult timp unicul sistem de abordare automată a examenului bacteriologic în microbiologie. Se utilizează un mediu modificat Middlebrook 7H9, în care unul dintre componenți este acidul palmitic marcat radioactiv cu 14C. Când micobacteria viabilă este prezentă în flaconul cu mediul de cultură, acidul palmitic radiomarcant este metabolizat și se eliberează CO₂ radioactiv în faza gazoasă. Valoarea 14 CO₂ și rata producerii de gaze este direct proporțională cu multiplicarea micobacteriilor din mediul lichid.

Sistemul BACTEC MGIT 960

Urmărindu-se a se elimina inconvenientele radiometriei, ulterior creșterea micobacteriilor a fost monitorizată colorimetric.

Sistemul BACTEC MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube) utilizează un mediu Middlebrook modificat, metoda fiind complet automată, folosind un indicator de fluorescență (film siliconat acoperit cu sare de ruteniu aflat la baza tubului). Oxigenul prezent în mod normal în mediu neutralizează fluorescența naturală a sării de ruteniu. Tuburile MGIT introduse în dispozitivul automatizat MGIT 960 sunt incubate și monitorizate automat la fiecare 60 de minute.

Dacă micobacteriile viabile sunt prezente în tub, oxigenul se consumă prin activitatea lor metabolică, efectul de neutralizare scade, iar baza tubului devine fluorescentă când este expusă la lumină ultravioletă. Multiplicarea bacteriilor poate fi citită manual, vizualizată prin prezența granulelor mici sau a precipitatelor în partea de jos a tubului sau utilizând un emițător portativ de lumină UV.

BacT/Alert 3D (cunoscut drept MB/ BacT)

Utilizează mediul lichid Middlebrook 7H9, tuburile având fixate pe fundul lor un detector colorimetric a cărui culoare virează de la verde închis la galben pe măsura acumulării de CO₂ produs prin creșterea micobacteriilor. Un dispozitiv reflectometric semnalează optic și sonor pozitivitatea culturii: 106–107 germeni.

Versa TREK

Flacoanele cu mediu lichid Middlebrook 7H9 îmbogățit cu mixturi antimicrobiene conțin un burete celulozic a cărei suprafață întinsă favorizează creșterea. Presiunea din flaconul cu mediu este monitorizată cu ajutorul unui manometru.

Dacă micobacteriile viabile sunt detectate în flaconul cu mediul de cultură, consumul de O_2 datorat metabolismului micobacterian determină reducerea presiunii interne. Mediile care prezintă o scădere a presiunii măsurate sunt raportate ca pozitive.

Rezultatele furnizate de către sistemele automate și semiautomate nu au semnalat diferențe considerabile între acestea, cu mențiunea că sistemul BACTEC MGIT960 s-a dovedit a avea performanțe superioare celorlalte (sensibilitate și rapiditate). Costurile mai ridicate ale acestor metode le fac utilizabile în țara noastră doar în cazuri selecționate care implică un diagnostic cât mai rapid și instituirea precoce a terapiei^{16,43,44}. Contaminarea cu floră normală din spută poate fi o problemă pentru toate aceste sisteme pe baza mediului lichid, probabil datorită suplimentului de creștere.

b) Metode de amplificarea nucleară

Metodele genice s-au dezvoltat pornind de la cunoașterea structurii ADN ca lanț de nucleotide {acid fosforic+bază purinică (adenină, guanină) și/sau pirimidinică (tiamină, citozină) +pentoză}. Copierea ADN se poate face pe structura ADN (replicare) sau pe structura ARN (transcripție), elongarea lanțului făcându-se în sensul 5' (capătul fosforic) - 3' (capătul pentozeic).

PCR este o tehnică de generare in vitro a numeroase copii (amplicon) ale unui segment specific de ADN pe principiul „șahului persan”. Identificarea ampliconilor se face cu ajutorul sondelor de hibridizare ADN, un lanț oligonucleotidic complementar cu secvența specifică. Procesul de hibridizare presupune atașarea sondei de secvența țintă²⁷.

Odată cu dezvoltarea tehnicii PCR în depistarea *M. Tuberculosis*, una dintre primele constatări a fost că, deși s-au studiat mai multe metode, nici una nu poate diferenția foarte corect *M. Tuberculosis* de alte specii din complexul *M. Tuberculosis*. Aceste limite se datorează similitudinii genomului componentelor complexului *Mycobacterium*²³.

PCR stă și la baza unor tehnici genice utile în diagnosticul bacteriologic al chimiorezistențelor. În ultimii ani au intrat în practica unor laboratoare performante de profil trei metode de amplificarea genică:

AMD (Amplified Myc. Tuberculosis)

Testul direct de amplificarea genică (AMTD) dezvoltat de GenProbe (San Diego, CA, USA) reprezintă un sistem de amplificarea izotermic (42°C) mediat de transcriptază. O secvență specifică de complex *M. Tuberculosis* localizată la nivelul genei ARN-ului ribozomal 16S produce ADN ribozomal dublu catenar prin acțiunea combinată a reverstranscriptazei și ribonucleazei. În schimb, ARN polimeraza catalizează sinteza de ARN ribozomal din ADN-ul ribozomal sintetizat anterior. Un nou ciclu începe când recentul ARN ribozomal continuă transcripția prin intermediul revers transcriptazei. Sensibilitatea metodei crește în prezența unui număr mare de molecule de ARN ribozomal 16S (câteva mii/celulă) comparativ cu doar o copie de ADN ribozomal 16S.

Metoda are avantajul reducerii riscului de contaminare și a incidenței rezultatelor fals pozitive datorate persistenței acizilor nucleici stabili (ADN) în organismul gazdă, chiar după eradicarea infecției²⁷.

Detectarea produșilor de amplificarea se bazează pe hibridizarea cu un lanț ADN monocatenar specific marcat cu o moleculă chemoluminiscentă³⁸. Întregul proces se desfășoară manual, începând prin extracția sonică, continuând cu adăugarea diferiților reactivi, până la citirea finală cu ajutorul unui detector de lumină. Ciclurile termice nu sunt necesare și întreaga etapă de amplificarea se desfășoară la o temperatură constantă de 42°. Timpul total este de 2,5 ore.

Sensibilitatea metodei variază între 91,7% și 100% în probele pozitive și între 65,5% și 92,9% în probele negative pentru BAAR la examenul microbiologic direct^{27,38}.

Testul Amplicor MTB

Testul Amplicor MTB (Roche Molecular Systems, Basel, Elveția) se bazează pe metoda PCR standard.

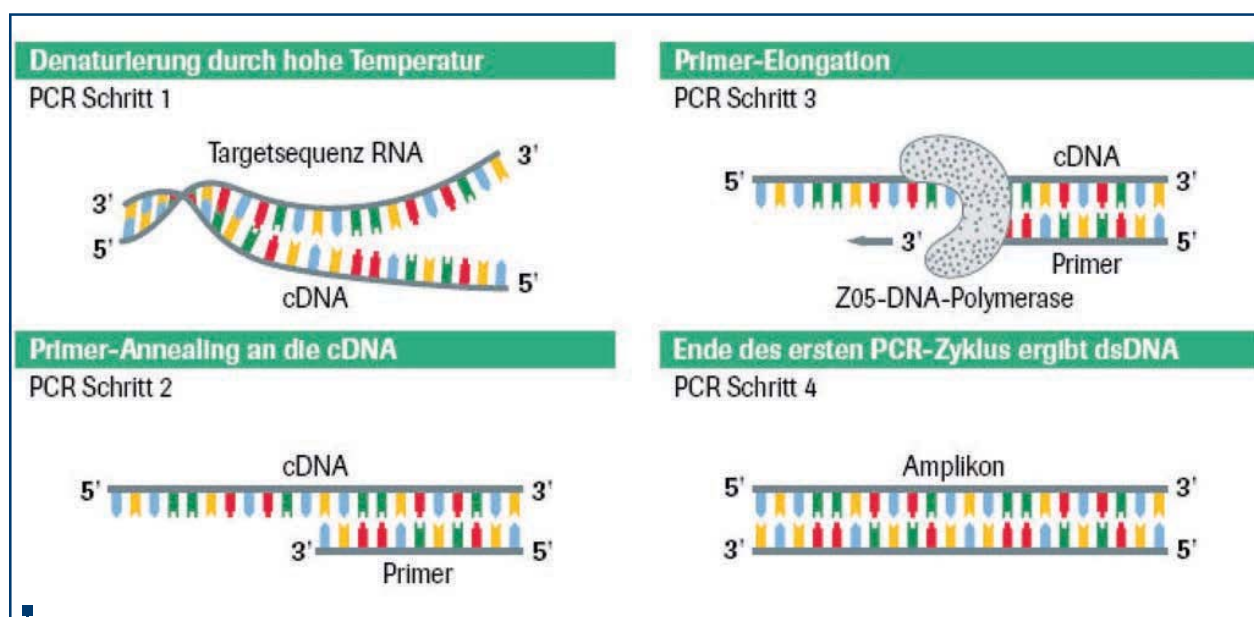


Figura 1. (COBAS® TaqMan® MTB-Test)

Secvența bp 584 a genei care codifică ARN-ul ribozomal 16S, ce cuprinde o regiune specifică de specie flancată de secvențe genice specifice, este amplificată prin utilizarea unor amorse. În amestecul de baze este prezentă o combinație neobișnuită: alături de adenină, guanină și citozină, în loc de tiamină se utilizează uracil. Ca o consecință, produsul de amplificare diferă, în sensul că se folosește uracil în loc de tiamină.

Acest dispozitiv face parte dintr-un sistem de control al contaminării bazat pe utilizarea uracil-N glicozilazei, o enzimă care fragmentează ADN-ul acolo unde uracilul este prezent. Enzima, adăugată probelor înainte de amplificare, distruge orice produs de amplificare fără a afecta însă ADN-ul care nu conține uracil. Datorită naturii specifice a secvențelor genice, ADN-ul ribozomal 16S care aparține oricărei specii micobacteriene este amplificat prin PCR.

Detecția produsului de amplificare se face adăugând un conjugat enzimatic cu avidină și o substanță cromogenă³⁸.

Etapele de amplificare și detecție sunt realizate automat de dispozitivul Amplicor Cobas (care permite amplificarea și detecția). Procesul se desfășoară la temperaturi de 95°C, iar timpul de lucru este de 6-7 ore. Detecția ADN-ului complexului *M. Tuberculosis* se poate realiza și fără ajutorul dispozitivului Cobas, prin utilizarea unui kit manual care nu include controlul intern (Figura 1).

Alte kit-uri sunt disponibile pentru detecția ADN-ului *M.avium* și *M.intracellulare* în probele clinice. Specificitatea atinge 100%, în timp ce sensibilitatea variază între 90% și 100% la produsele pozitive în microscopie și între 50% și 95,9% în produsele negative^{27,38}.

Etapele testului Amplicor MTB

Metoda presupune revers-transcrierea ARN țintă și amplificarea în cicluri succesive a secvenței ADNc rezultat.

BD ProbeTe ET

Utilizează polimeraza ADN și amplificarea lanțului ADN denaturat la temperatura constantă cu producerea unor copii IS6110, secvență de inserție unică pentru complexul *M. Tuberculosis*.

În prima fază (amplificarea secvenței țintă), amplificarea este inițiată de două perechi de amorse complementare secvențelor țintă. Elongația primerului proximal

(amorsa proximală) determină dislocarea amorsei distale elongate simultan, rezultând astfel produsul de amplificare.

Un sit restrictiv, prezent în amorsa distală, va fi prezent și în produsul de amplificare. În faza de amplificare exponențială, o nouă amorsă se atașează produsului de amplificare și, ca urmare a digestiei produse de enzima de restricție, fragmentul superior se comportă ca un primer și dislocă fragmentul inferior.

BD ProbeTec ET este un sistem semiautomat care permite amplificarea și detecția simultană a *M. Tuberculosis*^{1,23,27}.

Ținta amplificării este secvența inserției specifice IS6110M. Bovis are o secvență a genomului aproape identică cu a *M. Tuberculosis* (>99,95%). BD ProbeTec ET s-a dovedit foarte sensibilă în detecția *M. Bovis*, deși acesta generează un număr mic de copii ale secvenței inserției specifice. BD ProbeTec ET și-a dovedit utilitatea pentru detecția *M. Tuberculosis* în prelevate de la nivelul arborelui respirator, dar și în detecția *M. Tuberculosis* în probele recoltate de la cazurile de TB extrapulmonare.

Sensibilitatea tehnicii este de 98,5 până la 100% pentru probele pozitive și foarte variată, de 33 până la 100% pentru probele negative.

Deși specificitatea este bună, sensibilitatea redusă reprezintă limita majoră a metodelor bazate pe amplificarea genică.

Factorii care contribuie la reducerea sensibilității sunt distribuția inegală a bacililor în produs, extracția suboptimă a acizilor nucleici și, uneori, prezența inhibitorilor.

Pentru minimizarea riscului de contaminare, sistemele comerciale au simplificat tehnicile moleculare până la utilizarea undelor sonore și a tratamentului termic.

O categorie particulară de rezultate fals pozitive se referă la probele obținute de la pacienții aflați în tratament. La acești pacienți, detectarea ADN-ului micobacterian după o lungă perioadă de timp este bine cunoscută, în ciuda eficienței tratamentului, ceea ce face inutilă monitorizarea tratamentului prin aceste metode. ■

Va continua în următorul număr

1. Antognoli MC, Salman MD, Triantis J, Hernandez J, Keefe TA. Onetube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. *J Vet Diagn Invest* 2001;13:11-6.
2. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2734-40.
3. ***Antituberculosis drug resistance worldwide. *Weekly Epidemiol. Rec.* 2000; 75: 95-100.
4. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun* 2003; 4:4-11.
5. Cambau E, Jarlier V. Resistance to quinolones in mycobacteria. *Res Microbiol* 1996; 147: 52-9.
6. Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999; 34: 257-67.
7. Centers for Disease Control. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs worldwide, 2000-2004. *MMWR*. 2006; 55:301-5.
8. Chimara E, Ferrazoli L, Cardoso Leao S. *Mycobacterium tuberculosis* Complex Differentiation Using *gyrB* Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 745-8.
9. Costello E, O'Grady D, Flynn O, et al. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3217-22.
10. Crudu V, Romancenco E. Diagnostic microbiologic al tuberculozei - GHID, Ministerul Sanatatii din Rep. Moldova, Inst. de Ftiziopneumologie, Lab. National de Referinta in Microbiologia Tuberculozei, 2012.
11. Daley C, Kawamura L. The role of molecular epidemiology in contact investigations: a US perspective. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7(12): S458-62.
12. Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2163-8.
13. Erler W, Martin G, Sachse K, L et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2234-8.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC; 2011. www.ecdc.europa.eu
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Management of contacts of MDR TB and XDR TB patients. Stockholm: ECDC; 2012. www.ecdc.europa.eu
16. Framework for Implementing New Tuberculosis Diagnostics. WHO 2010, July. www.policyframework-july10.
17. Garcia-Pelayo MC, Caimi KC, Inwald JK, et al. Microarray analysis of *Mycobacterium microti* reveals deletion of genes encoding PE-PPE proteins and ESAT-6 family antigens. *Tuberculosis* 2004; 84:159-166.
18. Garcia de Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chave F, Alcalá L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2002, Vol. 40, No. 3, pp. 988-995.
19. Garcia de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: review discussing molecular approaches. *Clin Microbiol Infect*, 2003, Vol. 9, No.5, pp349-59.
20. Garcia de Viedma D, Alonso Rodriguez N., Andres S., Ruiz Serrano, M.J., Bouza E., Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 5660-5664.
21. Høidal E, Docker H, Caugant DA, Tverdal A. Pulmonary tuberculosis in Norwegian patients. The role of reactivation, reinfection and primary infection assessed by previous mass screening data and restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:300-307.
22. Heyman SJ, Brewer TF, Wilson ME. The need for global action against multidrug-resistant tuberculosis. *JAMA*, 1999 Vol. 281, No. 1, pp. 2138-2140.
23. Huard RC, Lazzarini LCO, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1637-50.
24. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strains differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14
25. Kaufmann S.H.E., Hahn H. *Mycobacteria and TB, Issues in Infectious Diseases*, vol. 2; 17-46; 97-102
26. Langendam M.W., van der Werf M.J., E. Huitric and D. Manissero. Prevalence of inappropriate tuberculosis treatment regimens: a systematic review. *Eur Respir J* 2012; 39: 1012-1020.
27. Marica C, Didilescu C, Murgoci Gh, Tanasescu M, Arghir O. *Compendiu de tuberculoză*, Ed. Curtea Veche, 2011.
28. Marinus Barnard, Linda Parsons, Paolo Miotto, Daniela Cirillo, Knut Feldmann, Cristina Gutierrez, Akos Somoskovi. Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay. Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. *FIND* 2012.
29. Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, et al. Macro-array and bioinformatics analyses reveal mycobacterial „core” genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2004; 150: 483-96.
30. Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay. Laboratory Manual for Resource-Limited Settings. *WHO-FIND*.
31. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, et al. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3594-9.
32. Kiraz N, Saglik I, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. Evaluation of the GenoType *Mycobacteria* Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59, 930-934.
33. Pai M, Flores LL, Pai N et al. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(10): 633-43.
34. Ramaswamy S, Musser J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 Update. *Tubercle and Lung Disease* (1998) 79(1), 3-29.
35. Richter E, Weizenegger M, Anne-Marie Fahr, Rusch-Gerdes S; Usefulness of the GenoType MTBC Assay for Differentiating Species of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cultures Obtained from Clinical Specimens. *Journal of clinical microbiology*. Sept. 2004, p. 4303-4306.
36. Rieder HL, Van Deun A, Kam KM, Kim SJ, Chonde TM, Trebucq A, Urbaniczik R. Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries. 2nd ed. Paris, France: *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2007.
37. Riska PF, Jakobs WR Jr, Alland. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. In *J Tuberc Lung Dis* 2000; 4(suppl 1):S4-S10.
38. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, et al. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBASAMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (4):1559-62.
39. Schilke K, Weyer K, Bretzel G, et al. Universal pattern of RpoB gene mutations among multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 7:620-6.
40. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on micobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3563-3571.
41. Torres M J, Criado A, Palomares JC and Aznar J. - Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2000, Vol. 38, No. 9, pp. 3194-3199.
42. Van Pinxteren LA. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 si CFP10. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2000; 7(2):155-160.
43. WHO. New laboratory diagnostic tools for tuberculosis control. Geneva: World Health Organization, 2008. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241597487>
44. WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3. ISBN 978 92 4 159919 1
45. WHO. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant Tuberculosis. *Policy statement* 2011. (www.who.int).