

# DETECTAREA PRIN TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ A TULPINILOR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* REZISTENTE LA RIFAMPICINĂ ȘI/SAU IZONIAZIDĂ FOLOSIND SISTEMUL GENOTYPE MTBDRPLUS

*Detection of Mycobacterium tuberculosis strains resistant to rifampicin and/or isoniazid by using the system of GenoType MTBDRplus*

Adriana Moisoiu<sup>1,2</sup>, Mircea-Ioan Popa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institutul de Pneumoftiziologie „Marius Nasta”, București

<sup>2</sup>Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

## REZUMAT

Tuberculoza (TB) rămâne una dintre cele mai importante provocări de sănătate publică în întreaga lume. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) estimează că aproximativ o treime din populația globului este infectată cu *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

Diagnosticul precoce, o terapie adecvată și măsuri de prevenire a transmiterii bolii sunt esențiale în vederea unui control eficient al TB. Problemele care apar sunt legate de managementul clinic și de prevenirea diseminării bolii la nivelul populației generale.

În ceea ce privește diagnosticul, depistarea precoce a infecțiilor cu *M. tuberculosis*, precum și stabilirea sensibilității la medicamentele anti-TB a tulpinilor izolate reprezintă abordări esențiale. Apariția metodelor moderne de diagnostic molecular a scurtat considerabil atât timpul necesar pentru diagnostic, cât și perioada în care se pot obține rezultatele privind sensibilitatea la medicamentele anti-TB. O astfel de metodă este reprezentată de GenoTypeMDRTBplus. Studiind 234 de produse recoltate în perioada octombrie-decembrie 2013, am depistat 161 de tulpini cu sensibilitate atât la rifampicină, cât și la izoniazidă, în timp ce alte 54 de tulpini prezentau rezistență. Alte rezultate ale investigației acestor tulpini vor fi prezentate în acest articol.

**Cuvine cheie:** GenoTypeMDRTBplus, *Mycobacterium tuberculosis*, MDR-TB, gena *rpoB*, gena *katG*

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains one of the most important public health challenges all over the world. World Health Organization (WHO) estimates that almost one third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

Early diagnosis, an adequate therapy, and preventions measures of disease spread are essential for an efficient control of TB. Problems that arise are related to the clinical management and prevention of dissemination of the disease in the general population.

In terms of diagnosis, of great importance is the early detection of *M. tuberculosis* and the detection of susceptibility to antituberculous drugs in the mycobacteriology laboratory.

The advent of new and modern methods of molecular diagnosis has considerable shortened the time in which the bacteriological diagnosis and susceptibility tests to antituberculous drugs are established. Such a test is GenoTypeMDRTBplus. Studying the 234 pathological prelevates positive to microscopy from the period October – December 2013, we have revealed that 161 strains were sensitive to rifampicin and isoniazid, and 54 strains were resistant. Others results of the study will be presented in this article.

**Keywords:** GenoTypeMDRTBplus, *Mycobacterium tuberculosis*, MDR-TB, *rpoB* gene, *katG* gene

Adresă de corespondență:

Dr. Adriana Moisoiu, Institutul de Pneumoftiziologie „Marius Nasta”, București, Șoseaua Viilor nr. 90, Sector 5, București

E-mail: amoisoiu55@gmail.com

## INTRODUCERE

Tuberculoza (TB) rămâne una din cele mai importante provocări de sănătate publică în întreaga lume în ultimele decenii. În raportul WHO din anul 2013 se estima că în anul 2012 la nivel mondial circa 8,6 milioane de persoane aveau TB și au fost înregistrate aproximativ 1,3 milioane de decese prin această boală. (1) Datele sunt foarte asemănătoare cu cele din estimările precedente.

Diagnosticul precoce, o terapie adecvată și măsurile de prevenire a transmiterii bolii sunt esențiale în vederea unui control eficient al TB. În ultima perioadă se discută din ce în ce mai mult despre TB cu germeni multi-rezistenți (MDR-TB) (infecția cu *M. tuberculosis* rezistent la RIF și HIN (2) și respectiv tuberculoza XDR (XDR-TB la care *M. tuberculosis* este rezistent la cel puțin 4 dintre medicamentele anti-TB de bază; tulpina este rezistentă la RIF, HIN, fluorochinolone și la cel puțin unul dintre medicamentele injectabile de linia a II-a).

Testarea sensibilității la medicamentele anti-TB prin metode clasice (ex. metoda proporțiilor pe mediul solid Lowenstein-Jensen) permite obținerea rezultatelor în câteva săptămâni. Clinicienii au nevoie de rezultate cât mai rapide privind rezistența la RIF și/sau HIN pentru a putea iniția tratamentul standard sau pentru a propune regimuri extinse la cazurile rezistente la aceste medicamente. În cazul în care tulpinile sunt sensibile, RIF și HIN distrug circa 99% dintre bacilii tuberculoși în primele 2 luni de la inițierea tratamentului. (2)

Metodele de biologie moleculară au făcut posibilă nu doar analiza mecanismului de apariție a mutațiilor ce determină rezistența la medicamentele anti-TB. Una dintre primele mutații detectate a fost cea care determină rezistența *M. tuberculosis* la RIF. (3-4) În 95% dintre cazurile de rezistență la RIF, aceasta apare din cauza mutațiilor în segmentul 81bp al genei *rpoB* ce codează subunitatea  $\beta$  a ARN polimerazei. (5)

Rezistența *M. tuberculosis* la RIF apare cu o frecvență de 1 la  $10^7$ - $10^8$  bacili tuberculoși. Mutațiile în regiunea *rpoB* au fost depistate la > 95% din tulpinile de *M. tuberculosis* rezistente la RIF. (6) Cele mai multe tulpini rezistente la RIF prezintă o singură mutație la nivelul acestei gene; mutațiile multiple se întâlnesc foarte rar. (7-8) Cea mai frecventă mutație ce survine în cca 81% dintre cazurile de rezistență la RIF afectează codonii 531 și 526 și determină o rezistență fenotipică ridicată, precum și o rezistență încrucișată cu alte rifamicine.

HIN (hidrazida acidului nicotinic) este un medicament anti-TB de primă linie (introdus în tra-

tamentul TB în 1952). Este un medicament foarte eficient (CMI cuprinse între 0,02 și 0,2 $\mu$ g/ml) care pătrunde rapid în țesuturi iar activitatea sa nu este influențată de pH-ul mediului. Rezistența la HIN a apărut rapid. (9) Rezistența la HIN reprezintă un pas spre apariția MDR-TB. Există regiuni în care 20-30% din tulpini sunt rezistente la HIN. (10)

Modalitatea de acțiune a HIN este foarte complexă. HIN este un precursor ce necesită activare cu participarea enzimei catalază-peroxidază (KatG) codificată de gena *katG*. După activare HIN împiedică sinteza acizilor micolici din peretele celular prin inhibiția reductazei NADH dependente enoil-ACP, ce este codificată de gena *inhA*. HIN este activă împotriva bacililor tuberculoși în faza de creștere, dar nu și împotriva bacililor dormanți. Oxigenul are un rol important în acțiunea HIN, în sensul că HIN nu este activă pe *M. tuberculosis* din tuberculoame.

Rezistența la HIN este determinată de alterări la nivelul mai multor gene. Mutațiile apărute în genele *katG* și *inhA* sunt cele mai frecvente (75-85%). Între 20% și 95% din tulpinile de *M. tuberculosis* rezistente la HIN au cel puțin o mutație în gena *katG* (11). Mecanismul de rezistență la HIN poate fi reprezentat de pierderea genei *katG* ce codează catalaza peroxidazică. Poate exista o deleție a genei *katG* sau pot exista mutații punctiforme (ce sunt mult mai frecvente decât deleția).

Rezistența la HIN poate apărea și prin mutații în gena structurală *inhA* (codează NADH-dependență de enoil-ACP reductază). Această mutație apare la 15-43% din tulpinile de *M. tuberculosis* HIN rezistente. Marea majoritate a tulpinilor care au o mutație în *inhA*, dar fără mutații în *katG* au de obicei o rezistență relativ scăzută (> 0,2 $\mu$ g/ml și < sau egală cu 1  $\mu$ g/ml) (12). S-a demonstrat că pot exista mutații și în alte gene, cum ar fi *furA*, *Rv 0340-0343*, *Rv1772*, *fadE24*, *efpA*, etc (12). Aceste mutații sunt legate în marea lor majoritate de mutații în gena *katG* și/sau în promoterul genei *inhA*, făcând greu de interpretat rolul lor în rezistența la HIN.

Există studii care au demonstrat o strânsă asocieră între mutațiile din genele *katG*, *inhA* și *ahpC* și rezistența la HIN. (12-14)

Metodele de biologie moleculară care permit evidențierea mutațiilor responsabile de rezistența la medicamentele anti-TB scurtează foarte mult timpul necesar obținerii acestei informații și pot avea relevanță în punerea diagnosticului de MDR-TB și inițierea tratamentului corespunzător.

Sistemul de detecție prin tehnici de biologie moleculară a rezistenței la RIF și/sau HIN, produs de HAIN Lifescience, a fost recomandat de OMS

pentru laboratoarele de nivel 3 încă din anul 2008. (15) Acest sistem a intrat în practica laboratoarelor naționale de referință (LNR) pentru bacteriologia tuberculozei din România în a doua jumătate a anului 2013.

## MATERIALE ȘI METODE

Studiul prospectiv s-a desfășurat în perioada octombrie-decembrie 2013. Prelevatele clinice au fost reprezentate de: spute, aspirate bronșice și lichide pleurale provenite de la pacienți internați în Institutul de Pneumoftiziologie „Marius Nasta” (IPMN) cu suspiciunea de TB pulmonară sau pacienți tratați anterior pentru TB pulmonară și re-internați pentru control. Au fost luate în considerare doar prelevatele pozitive pentru bacili acido alcooloz rezistenți (BAAR), în număr de 234. Toate prelevatele au fost cultivate și pe mediul solid Lowenstein-Jensen (LJ) pentru obținerea culturilor din care ulterior s-au efectuat antibiogramele de primă linie (HIN și RIF).

Sputele și aspiratele bronșice primite în laborator în perioada octombrie-decembrie 2013 au fost prelucrate prin metoda Petroff cu NaOH, în timp ce lichidele pleurale au fost centrifugate și însămânțate direct pe mediul LJ. Din toate prelevatele clinice s-au efectuat frotiuri ce au fost colorate cu auramină-rodhamină și examinate la microscopul cu fluorescență.

Cele 234 de prelevate clinice pozitive pentru BAAR au fost transferate apoi în sectorul de biologie moleculară al laboratorului în vederea identificării moleculare cu ajutorul testului GenoType MTBDR<sub>plus</sub> ver 2.0.

Testul a fost efectuat conform instrucțiunilor date de producător (16): 1 ml de prelevat decontaminat a fost transferat într-un tub de 1,5 ml cu capac filetat și centrifugat pentru 15 minute la 10.000 x g. S-a îndepărtat supernatantul, iar sedimentul rămas a fost resuspendat în 100 μl GenoLyse prin vortexare. Proba a fost apoi incubată pentru 5 minute la 95°C în baia de apă și apoi centrifugată (*spin-down*), după care s-au adăugat 100 μl de tampon (*Neutralization Buffer*) și s-a vortexat 5 secunde; ulterior s-a centrifugat pentru 5 minute la viteza maximă a centrifugii. 5 μl din supernatant (ADN) s-au utilizat apoi direct în reacția de amplificare genetică (PCR).

În incinta *DNA-free* se adaugă la 5 μl de probă 10 μl reactiv AM-A și 35 μl reactiv AM-B, astfel încât volumul final pentru o probă este de 50 μl.

Amplificarea ADN-ului s-a efectuat în termocycler utilizând programul „MDR DIR” pentru produse clinice, după cum urmează: 15 minute la

95°C = 1 ciclu; 30 de secunde la 95°C și 2 minute la 65°C = 20 de cicluri; 25 de secunde la 95°C, 40 de secunde la 50°C și 40 de secunde la 70°C = 30 de cicluri; 8 minute la 70°C = 1 ciclu.

Hibridizarea probelor s-a efectuat automat cu ajutorul aparatului de la HAIN Lifescience, cu încălzirea prealabilă a soluțiilor de hibridizare (HYB) și clătire (STR) la 37°C.

## REZULTATE

În perioada octombrie-decembrie 2013 au fost testate 234 de prelevate clinice unice, pozitive microscopic, provenind de la pacienți internați în IPMN cu suspiciunea de TB pulmonară sau pacienți aflați în retratament cu medicamente anti-TB; unii dintre pacienți se aflau în evidența secției MDR-TB din institut. În cazul a 11 prelevate nu s-a detectat prezența complexului pentru *M. tuberculosis* (MTC), iar 8 dintre teste nu au putut fi interpretate. Ca urmare probe valide au fost în număr de 215. Dintre acestea în cazul a 161 de prelevate (74,88%) s-a înregistrat sensibilitate atât la RIF, cât și la HIN, iar 54 (25,11%) au prezentat rezistență. Dintre situațiile în care am detectat rezistența, 7 (12,96%) au prezentat rezistență doar la RIF; 9 (16,66%) au prezentat rezistență doar la HIN și 38 (70,37%) au prezentat atât rezistență la RIF, cât și la HIN, încadrându-se astfel în categoria de MDR-TB.

Performanțele testării cu sistemul GenoType MTBDR<sub>plus</sub> ver 2.0 au fost comparate cu rezultatele obținute prin metoda clasică. Din cele 54 de probe depistate cu rezistență prin biologie moleculară, în 7 cazuri (12,96%) nu s-a depistat creșterea pe mediul LJ, iar în unul dintre cazuri cultura s-a supraînfectat și nu s-a putut testa sensibilitatea. Prin metoda fenotipică 2 probe au fost depistate cu sensibilitate atât la RIF cât și la HIN, 6 probe (11,11%) au fost rezistente doar la RIF, 6 probe (11,11%) au fost rezistente doar la HIN și 32 de probe (59,25%) au prezentat rezistență atât la RIF, cât și la HIN. (Tabelul 1 și 2)

**TABELUL 1.** Comparație între metoda genotipică și fenotipică de testare a sensibilității pentru RIF și HIN

Rata rezistenței	GenoTypeMTBDR <sub>plus</sub> nr. (%)	Metoda fenotipică nr. (%)
RIF	7 (12,96%)	6 (11,11%)
HIN	9 (16,66%)	6 (11,11%)
RIF+HIN	38 (70,37%)	32 (59,25%)
		2 sensibile RIF+HIN
		7 probe fără creștere
		1 probă supraînfectată
Total	54 probe	54 probe

Analiza mutațiilor apărute efectuată cu ajutorul sistemului GenoType MTBDR*plus* a arătat că cea mai frecventă mutație în gena *rpoB* este MUT3, apărută la 30 (66,67%) din cele 45 probe care au prezentat rezistență la RIF. Celelalte mutații detectate în gena *rpoB* au fost în ordine descrescătoare: MUT1, detectată la 4 probe (8,88%), MUT2A la 2 probe (4,44%), în timp ce MUT 2B nu a fost detectată la niciuna din probe. Au existat și 6 probe la care una sau 2 benzi de amplificare au fost absente, dar la care nu s-au detectat mutații. Aceste probe au fost interpretate ca având rezistență la RIF determinată de mutații necunoscute.

În ceea ce privește rezistența la HIN, mutația cea mai frecventă în gena *katG* a fost MUT1, întâlnită la 43 (91,48%) din cele 47 de probe având rezistență la HIN, în timp ce MUT 2 a fost detectată la o singură probă (2,12%). În gena *inhA* la 10 dintre probe (21,27%) a fost detectată MUT1, restul mutațiilor fiind absente. (Fig. 1)

## DISCUȚII

*M. tuberculosis* este unul dintre germeii care au dezvoltat variate mecanisme de rezistență la acțiunea medicamentelor anti-TB, cum ar fi mutații la nivelul genelor ce codifică diverse proteine țintă. Detectarea fenomenului de rezistență prin metode fenotipice durează foarte mult. Scurtarea perioadei se poate realiza prin introducerea în practică a tehnicilor de biologie moleculară care se pot efectua direct pe prelevatele clinice; rezultatele pot fi obținute în mai puțin de 24 de ore.

În prezentul studiu au fost analizate cu ajutorul sistemului GenoType MTBDR*plus* mutațiile apărute la nivelul genei *rpoB*, ce determină rezistența la RIF și mutațiile din genele *katG* și *inhA*, responsabile de apariția rezistenței la HIN. Cunoașterea rezistenței la RIF și HIN este deosebit de importantă deoarece definește o tulpină MDR-TB.

**TABELUL 2.** Rezistența fenotipică după testarea pe mediul LJ la RIF și HIN

Nr. probă	Rez. la RIF	Rez. la HIN	Nr. probă	Rez. la RIF	Rez. la HIN
20724	R	R	22992	R	S
20730	R	R	23116	S	R
20949	R	R	23123	S	R
21066	R	R	23404	R	R
21271	S	R	23504	R	S
21293 Lipsă creștere			23517	R	R
21323	R	R	23518	R	R
21452	R	R	23594	R	R
21543	S	R	23682	S	S
21584	R	S	24017	R	R
21677	R	R	24019 Lipsă creștere		
21707	R	R	24020	R	R
21902	R	R	24233	R	R
21904	R	R	24243	R	S
21919	S	R	24247 Lipsă creștere		
22054 Lipsă creștere			24361	R	R
22225	R	R	24362	R	R
22257	R	R	24493	S	R
22417	R	R	24785	R	R
22421	R	R	24810	R	R
22423 Lipsă creștere			24813 Lipsă creștere		
22500	R	S	24975	R	S
22502	R	R	25124	S	S
22503	R	R	25161	R	R
22559	R	R	25542	R	R
22655	S	R	26094	R	R
22799	Contaminare	R	26714 Lipsă creștere		

Nr. prelevat	<i>rpoB</i>	WT1	WT2	WT3	WT4	WT5	WT6	WT7	WT8	MUT1	MUT2 A	MUT2 B	MUT3	<i>katG</i>	WT	MUT.1	MUT.2	<i>inhA</i>	WT.1	WT.2	MUT-1	MUT-2	MUT-3A	MUT-3B
20724	■				■	■	■	■	■							■			■	■				
20730	■				■	■	■	■	■	■						■			■	■				
20949	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
21066	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■	■			
21271	■				■	■	■	■	■							■			■	■				
21293	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
21323	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
21452	■	■	■	■	■	■	■	■					■		■						■			
21543	■	■	■	■	■	■	■	■	■							■			■	■				
21584	■	■	■	■	■	■	■	■							■				■	■				
21677	■	■	■	■	■	■	■	■								■			■	■				
21707	■	■	■	■	■	■	■	■	■							■			■	■				
21902	■	■	■	■	■	■	■				■					■						■		
21904	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■					■	■		
21919	■	■	■	■	■	■	■	■	■						■						■	■		
22054	■	■	■	■	■	■	■	■					■		■				■	■				
22225	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
22257	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
22417	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
22421	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■						■		
22423	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
22500	■	■	■	■	■	■	■	■					■		■				■	■				
22502	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■		■		
22503	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
22559	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
22655	■	■	■	■	■	■	■	■	■							■			■	■				
22799	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
22992	■	■	■	■	■	■	■	■					■		■				■	■				
23116	■			■	■	■	■	■	■							■			■	■				
23123	■	■	■	■	■	■	■	■	■							■			■	■				
23404	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
23504	■	■	■	■	■	■	■	■					■		■				■	■				
23517	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
23518	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
23594	■	■		■	■	■	■	■	■							■			■	■				
23682	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
24017	■	■	■	■	■	■	■	■			■					■			■	■		■		
24019	■			■	■	■	■	■	■							■			■	■				
24020	■			■	■	■	■	■	■							■			■	■				
24233	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
24243	■	■	■	■	■	■	■	■							■				■	■				
24247	■	■	■	■	■	■	■	■		■									■	■				
24361	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
24362	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
24493	■	■	■	■	■	■	■	■	■							■			■	■				
24785	■	■	■	■	■	■	■	■	■							■			■	■				
24810	■	■		■	■	■	■	■		■						■			■	■				
24813	■	■	■	■	■	■	■	■		■						■			■	■				
24975	■	■	■	■	■	■	■	■							■				■	■				
25124	■	■	■	■	■	■	■	■					■				■		■	■				
25161	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				
25542	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■					■	■		
26094	■	■	■	■	■	■	■	■					■		■						■	■		
26714	■	■	■	■	■	■	■	■					■			■			■	■				

FIGURA 1. Pattern-ul de rezistență depistat cu ajutorul sistemului GenoType MTBDRplus

Mutația 3 din gena *rpoB* este responsabilă de majoritatea rezistențelor la RIF și este comparabilă ca frecvență a apariției cu cea raportată de autori din Pakistan și Canada, (17-18) dar inferioară celei găsită în USA sau Africa. (19-21)

În ceea ce privește rezistența la HIN, aceasta este determinată de mutațiile din gena *katG* și în special de MUT1, apărută la 91,48% din probele

rezistente. Mutațiile din gena *inhA* sunt și ele determinate de MUT1, niciuna din celelalte mutații nefiind detectate.

În prezentul studiu 2 dintre probele cu mutații atât în gena *rpoB* cât și în gena *katG* (interpretate ca fiind rezistente la RIF și HIN) s-au dovedit fenotipic sensibile atât la RIF, cât și la HIN. Pentru cele 7 probe pentru care nu s-a obținut creștere pe mediul



LJ și care genotipic au fost rezistente atât la RIF, cât și la HIN s-au dovedit a fi prelevate clinice de la pacienți internați în secția de MDR-TB cărora li se aplicau medicamente anti-TB în scheme extinse.

Dintre limitele acestui studiu ne putem gândi la numărul relativ mic de situații cu rezistență, rezultând astfel necesitatea continuării evaluării în vederea obținerii unor valori de inferență statistică. În cazul probelor pentru care nu s-a reușit detectarea mutației specifice pentru RIF, ne propunem punerea la punct a colaborării cu alți colegi din țară și străinătate în vederea investigării acestor situații.

## CONCLUZII

Efectuarea testării tuturor prelevatelor patologice pozitive pentru BAAR la examinarea microscopică cu ajutorul testului GenoType *MTBDRplus* permite atât detecția MTC în respectivul prelevat patologic, cât și testarea sensibilității la RIF și HIN;

astfel pot fi evidențiate situațiile în care sunt implicate tulpini MDR-TB. Rezultatele se pot obține în mai puțin de 24 de ore. Ca atare se scurtează considerabil timpul în care clinicianul este informat asupra prezenței MTC în respectivul prelevat patologic și se obțin informații valoroase referitoare la sensibilitatea/rezistența la RIF și HIN. În acest mod clinicianul poate lua o decizie cu privire la regimul terapeutic ce trebuie aplicat. Cu toate că sensibilitatea și specificitatea testului GenoType *MTBDRplus* este mare, se impune însămânțarea prelevatului patologic prelucrat corespunzător pe medii de cultură solide (LJ, Middlebrook 7H10 sau 7H11) sau lichide în sisteme de de tip BACTEC sau VersaTREK, în vederea urmăririi creșterii în cultură a BAAR și pentru testarea sensibilității la medicamentele anti-TB și prin metoda clasică.

Utilizarea testului GenoType *MTBDRplus* pentru toate prelevatele clinice BAAR pozitive reprezintă o alternativă utilă pentru clinicieni.

## BIBLIOGRAFIE

1. WHO Global Tuberculosis Report 2013; [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
2. Veluchamy M., Madhavan R., Narayana S., Rajesh L. KatG Gene as a Surrogate Molecular Marker Leading to Cause Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Am J Inf Dis Microbiol* 2013; 1(5):86-91.
3. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., et al. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(10):2054-8.
4. Popa M.I., Garin B., Popa L., Kassa E. Detectarea rapidă a rezistenței la rifampicină a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis*. *Infomedica* 1997; 1:31-3.
5. Wang S., Zhao B., Song Y., et al. Molecular characterisation of the *rpoB* gene mutations of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from China. *J Tub Res* 2013; 1(1):1-8.
6. Palomino J.C. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009; 56(2):103-11.
7. Murray M., Nardell E. Molecular Epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge, *Bull World Health Org* 2002; 80:477-482.
8. Murray M. Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(3):1538-1543.
9. Choremis C., Pantazis S., Stroumbou S. Comparative resistance determination of the tubercle bacillus to streptomycin, isoniazid (INH) and to a mixture of streptomycin and isoniazid, in vitro. *Helv Paediatr Acta* 1953; 8(6):561-6.
10. Gamboa F., Fernandez G., Padilla E., et al. Comparative evaluation of initial and new version of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3):684-689.
11. Cornaglia G., Courcol R., Herrmann J.L., et al. *European Manual of Clinical Microbiology*, first edition, ESCMID, 2012.
12. Soini H., Musser J.M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clin Chemistry* 2001; 47(5):809-814.
13. Lunca C., Dorneanu O.S., Diculencu D., et al. Molecular detection of rifampicin resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from North-Eastern Romania. *Rev Rom Med Lab* 2013; 21(3-4):293-298.
14. Dhole T.N., Kant S., Kumar M., et al. Use of GenoType *MTBDRplus* assay to assess drug resistance and mutation patterns of multidrug-resistant tuberculosis isolates in northern India. *Ind J Med Microbiol* 2013; 31(3):230-236.
15. WHO – New laboratory tools for tuberculosis control. 2009.
16. GenoType *MTBDRplus* ver 2.0/2012, HAIN Lifescience GmbH, Nehren, Germany.
17. Farooki J.Q., Khan E., Alam S.M.Z., et al. Line probe assay for detection of rifampicin and isoniazid resistant tuberculosis in Pakistan. *J Pak Med Assoc* 2012; 62(8):767-772.
18. Bolotin S., Alexander D.C., Chedore P., et al. Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ontario, Canada. *J Antimicrob Chemotherapy* 2009; 64:263-266.
19. Somoskovi A., Dormandy J., Mitsani D., et al. Use of Smear-Positive Samples To Assess the PCR-Based Genotype *MTBDR* Assay for Rapid, Direct Detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex as Well as Its Resistance to Isoniazid and Rifampin. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12):4459-4463.
20. Barnard M., Albert H., Coetzee G., et al. Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:787-792.
21. Miotto P., Saleri N., Dembele M., et al. Molecular detection of rifampin and isoniazid resistance to guide chronic TB patient management in Burkina Faso. *BMC Inf Dis* 2009; 9:142.