

Curso de temas avançados de tuberculose - aula 12

Métodos moleculares no diagnóstico da tuberculose e na resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas.

Molecular methods in diagnosis of tuberculosis and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to drugs.

Flávia A. D. de Freitas¹, Helio R. de Siqueira², Rodolpho M. Albano¹.

RESUMO

A tuberculose, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é a doença infecto-contagiosa, produzida por um único microorganismo, que mais causa óbitos de indivíduos adultos no mundo. O objetivo deste artigo é revisar a metodologia para a identificação do *Mycobacterium tuberculosis* e analisar a resistência aos medicamentos isoniazida e rifampicina, no tratamento desta doença, por métodos de biologia molecular que são cada vez mais utilizados, por sua grande sensibilidade e especificidade, apesar do custo ser ainda elevado.

Descritores: tuberculose, diagnóstico, biologia molecular.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infection contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and has been described as the main responsible by adult death, by the only one microorganism, in the World. The aim of this article is a review of methodology to identify the *Mycobacterium tuberculosis* and to analyze the resistance for isoniazid and rifampicin by biological and molecular methods, which have been used more frequently due to high sensibility and specificity, in spite of their high price.

Keywords: tuberculosis, diagnosis, molecular biology.

INTRODUÇÃO

Atualmente a tuberculose (TB) é a doença infecto-contagiosa, causada por um único microorganismo, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que mais causa óbitos de indivíduos adultos no mundo. Estima-se que, nesta década, ocorrerão mais de 80 milhões de novos casos e 20 milhões de óbitos. A maioria destes pacientes encontra-se em países do terceiro mundo, onde a associação de políticas inadequadas de saúde pública e uma situação socioeconômica desfavorável contribui para a manutenção deste flagelo. Com a pandemia do HIV/AIDS, os países do primeiro mundo

também tiveram um aumento no número de casos da doença, com a transmissão ocorrendo, principalmente, em hospitais e prisões.¹

Com exceção das quinolonas, antibiótico inicialmente desenvolvido para combater infecções por germes comuns, mas que tem poder bactericida sobre o Mtb, há mais de 40 anos não surge um novo medicamento para o tratamento da TB, enquanto a resistência primária vem aumentando gradativamente no mundo, com o surgimento de multirresistência (MR) – resistência, pelo menos, à isoniazida (INH) e à rifampicina (RMP) - e de TB-XDR - TB MR

1. Laboratório de Genoma. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

2. Disciplina de Pneumologia e Tisiologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Trabalho realizado no Laboratório de Genoma. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Não há conflito de interesses.

Endereço para correspondência: Helio Ribeiro de Siqueira. Rua Pontes Correa, 38, apto. 501, Tijuca, CEP 20510-050, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel: 55 21 2208-0015. E-mail: drhelio@infolink.com.br.

Recebido em 22/05/2009 e aceito em 30/06/2009, após revisão.

com resistência associada a uma quinolona e a um medicamento injetável (amicacina, canamicina ou capreomicina). Estes fatos trazem a necessidade de se diagnosticar rapidamente os casos MR para uma terapia eficaz.

MÉTODOS CONVENCIONAIS DE DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE E DE RESISTÊNCIA

Com o aumento progressivo da resistência primária no mundo, a cultura para micobactérias e o teste de sensibilidade aos medicamentos deveriam ser realizados já no início do tratamento. Mas estes exames se tornam muito importantes, diríamos obrigatórios, nos casos em que a baciloscopia do escarro permanece positiva após o segundo mês de tratamento, ou negativa inicialmente e positiva, a seguir, durante o tratamento. A mesma necessidade de cultura e teste de sensibilidade tem que ser considerada nos casos de recidiva, de contato com pessoas com suspeita de terem TB resistentes, de pacientes HIV que adquirem TB em ambiente hospitalar, de presos ou de pessoas em abrigos e de profissionais de saúde que adoecem.

Os testes de sensibilidade aos fármacos utilizados no tratamento requerem o isolamento do *M. tuberculosis* do espécime clínico em um meio de cultura adequado, como o de Löwenstein-Jensen e Ogawa. Essa etapa de isolamento do bacilo é bastante lenta (três a seis semanas). Vários métodos podem ser utilizados para testar a sensibilidade do *M. tuberculosis*, sendo o das proporções o mais empregado.² Os resultados desse método são reportados como a porcentagem do total da população bacteriana resistente a um determinado fármaco. Isto é definido pela quantidade do crescimento no meio de cultura contendo o fármaco, quando comparado ao crescimento em meio sem o fármaco. Este método necessita de 28 dias para ser concluído (após a cultura inicial), tempo por demais dilatado para uma decisão clínica. Métodos alternativos e mais rápidos também podem ser utilizados como MODS - observação microscópica da sensibilidade às drogas - que detecta precocemente o crescimento do *M. tuberculosis* em meio líquido e determina o teste de sensibilidade (mas com risco de contaminação do profissional durante o procedimento) e o método Alamar Blue, que é um corante indicador que mede a proliferação da micobactéria, quantitativamente, através da oxidação-redução (REDOX), produzindo uma mudança colorimétrica.

O teste de sensibilidade para isolados de *M. tuberculosis* também pode ser realizado por técnicas automatizadas, como o sistema BACTEC MGIT 960 (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*). Esse método pode reduzir o tempo de identificação dos microrganismos resistentes aos fármacos para três semanas, mas é dispendioso para uso hospitalar de rotina.³

MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

Os mecanismos genômicos associados à multiresistência do *M. tuberculosis* geralmente envolvem mutações nos genes que codificam determinadas proteínas, que são inibidas pelas drogas ou que as metabolizam. As mutações podem produzir trocas de aminoácidos, que geram uma proteína com menos atividade ou afinidade pela droga, ou modificar a ação dos promotores dos genes, alterando a expressão gênica. Cada droga apresenta, pelo menos, uma proteína envolvida em seu metabolismo, que pode ser modificada por mutações genéticas. Através de métodos moleculares, estas mutações podem ser detectadas com rapidez, alta sensibilidade e especificidade.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é a técnica onde uma curta região de um gene, de um determinado DNA, é copiada muitas vezes por uma enzima DNA polimerase. As seqüências de nucleotídeos das extremidades da região a ser amplificada devem ser conhecidas para que dois pequenos oligonucleotídeos (iniciadores) possam hibridizar (se ligar) com a molécula de DNA, cada um com uma das fitas da dupla hélice (Figura 1).

Para iniciar uma amplificação por PCR, prepara-se uma mistura (mix) com os quatro tipos de nucleotídeos (dNTPs), magnésio, enzima DNA polimerase, tampão da enzima e os oligonucleotídeos. Em seguida, essa mistura é aquecida a 95°C para a desnaturação (separação) da dupla fita do DNA. Assim, cada fita de DNA-molde fica livre para, em uma temperatura mais baixa, os iniciadores se hibridizarem, permitindo que a DNA polimerase sintetize as novas fitas complementares. Em um novo ciclo, a mistura é então reaquecida a 95°C, para que as fitas recém-sintetizadas se separem (desnaturação) e resfriadas, permitam que mais iniciadores se hibridizem com estas fitas, repetindo-se os ciclos com a formação de outras fitas complementares. As reações de PCR se fazem de maneira exponencial e, em uma reação de 35 ciclos, por exemplo, ocorrem $2^{(35+1)} = 2^{36} = 68$ bilhões de cópias (amplicons) da região desejada do gene. O resultado da reação é lido por eletroforese em gel de agarose. Atualmente a técnica de PCR em tempo real (RT PCR) executa as reações e reproduz o resultado automaticamente. Esta sigla é muitas vezes confundida com a técnica de transcriptase reversa PCR usada para amplificar fitas de RNA.

A PCR tem sido amplamente utilizada em biologia molecular, devido a sua rapidez e eficácia. Para o diagnóstico de TB em material de escarro, esta técnica possui média sensibilidade (65%) e grande especificidade (acima de 90%), e pode ser realizada em algumas horas. Algumas limitações são a possibilidade de contaminação da amostra (o que pode gerar um resultado falso positivo), a

presença de proteínas inibidoras da reação (o que geraria um resultado falso negativo) e o custo desta metodologia, que ainda é elevado. A sensibilidade do método se prende, ainda, ao número de bacilos presentes no es-

carro. Quando o escarro é positivo na pesquisa de BAAR (presença de 5 mil a dez mil bacilos por mililitro), a reação de PCR é positiva e sua sensibilidade cai com o menor número de bacilos existentes no material analisado.

A. Cadeia de aminoácidos codificada (parte de uma proteína) e códons

1				5						10
GTC	CCC	GAG	AGC	CAC	CCA	CCC	ATT	ACA	CGA	
Valina	Prolina	Ac.Glutâmico	Serina	Histidina	Prolina	Prolina	Isoleucina	Treonina	Arginina	

B. PCR

Oligonucleotídeos (*Primers*) da PCR. Suponhamos a amplificação de um pequeno segmento do DNA.
O aquecimento no início de cada reação separa as fitas de DNA (desnaturação).

O oligonucleotídeo senso vai ser igual ao início da fita superior do DNA 5' GTGCCCGAGCAAC 3' que vai se anelar com o início da fita inferior, para dar início a uma nova dupla fita.

O oligonucleotídeo anti-senso vai ser o complemento da fita superior, no limite da região amplificada 3' GTGGCCTCGGCGA 5' que vai se anelar com a fita superior, para dar início a uma nova dupla fita

5' GTGCCCGAGAGCCACCCACCCATTACAGAAACCACCCACCGGAGCCGCT 3'
 3' GTGGCCTCGGCGA 5'

5' GTGCCCGAGAGCC 3' →
 3' CACGGGCTCTCGGGGTGGGTAATGTCTTTGGTGGTGGCCTCGGCGA 5'

Conforme nomenclatura internacional, os oligonucleotídeos são descritos no sentido 5' → 3'

Oligonucleotídeo senso
 5' GTGCCCGAGAGCC 3'

Oligonucleotídeo anti senso.
 5' AGCGGCTCCGGTG 3'

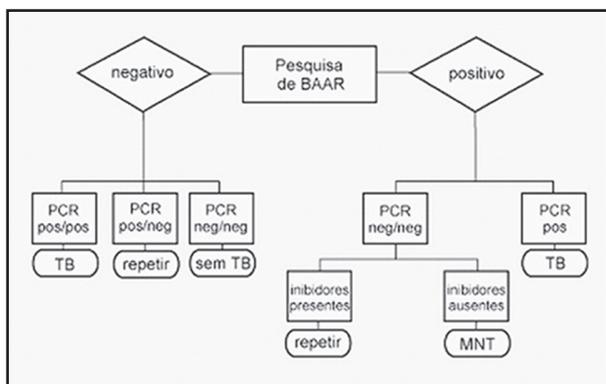
A. cadeia de aminoácidos codificada. Cada três nucleotídeos condifica um aminoácido.

B. PCR - exemplo de escolha dos oligonucleotídeos. Tendo-se apenas a fita superior, o oligonucleotídeo anti-senso vai ser o inverso do seu complemento. A seguir mostra-se a amplificação por PCR de um segmento do gene.

Figura 1 – Cópias do fragmento de DNA desejado (*amplicons*).

Para otimização do diagnóstico de tuberculose pela PCR, e para que sejam minimizadas as possibilidades de resultados falso negativos ou positivos, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) padronizou e publicou um quadro de regras a serem seguidas (Figura 2). Como pode ser observado, se a pesquisa BAAR de um paciente apresentar resultado negativo, devem ser realizadas duas PCRs. Sendo os dois resultados positivos, o diagnóstico de tuberculose é determinado; sendo um positivo e outro ne-

gativo, é necessário que se repita o procedimento e sendo os dois negativos, o diagnóstico de TB é descartado. Entretanto, se a pesquisa de BAAR apresentar resultado positivo, e a reação de PCR for positiva, confirma-se o diagnóstico específico de *Mycobacterium tuberculosis* e sendo negativa, a PCR é repetida. Esta segunda PCR, ao apresentar novamente resultado negativo, aponta para duas possibilidades: a presença de inibidores na reação ou a presença de *Mycobacterium* não *tuberculosis* no paciente.



TB – diagnóstico de tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*).
MNTB – *Mycobacterium não tuberculosis*.

Figura 2 – Quadro de regras do CDC para diagnóstico da tuberculose por PCR.

Além da reação em cadeia da polimerase *in house*, existem kits comerciais para o diagnóstico da tuberculose. Dentre os kits existentes, apenas o AMTD, o Amplicor e o EMTD foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), para amostras respiratórias com baciloscopia positiva, e apenas o EMTD foi aprovado para amostras com baciloscopia negativa.

DIAGNÓSTICO DE MULTIRRESISTÊNCIA POR BIOLOGIA MOLECULAR

Ao contrário da resistência à RMP, em que a maioria das mutações se concentra em uma pequena faixa de um só gene, a resistência à INH é mais complexa, pois pode ocorrer por mutações em vários genes, sendo os mais importantes o *katG* (32 a 93% dos casos) e o *inhA* (de 15 a 25%).⁴

O gene *katG* codifica a enzima catalase-peroxidase, importante no metabolismo do bacilo.⁵ Esta enzima ativa a INH, que é uma pré-droga, produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácidos micólicos da parede bacilar e produzem dano no DNA.^{6,7} A mutação mais comum no gene *katG* surge no códon 315 (Figura 3) pela substituição do aminoácido serina (AGC) por treonina (ACC), com diminuição da ação catalase, o que resulta em resistência à INH.⁸ O gene *inhA* codifica a enzima carreadora de enoil – acil (ACP) redutase - NADH dependente, importante na síntese de ácidos micólicos. Um dos produtos da INH ativada – o radical acil isonicotínico – liga-se à NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e impede a atividade da enzima, resultando na morte da bactéria, por interferência na síntese do ácidos micólicos.⁹ A mutação estrutural do gene *inhA* faz com que a enzima modificada perca afinidade pela NADH e a bactéria se torna resistente à INH.¹⁰

A RMP inibe a transcrição gênica da micobactéria por bloqueio da RNA-polimerase DNA dependente, o que impede a síntese de RNA mensageiro (mRNA), produzindo morte celular.⁶ Cerca de 95% das cepas resistentes à rifampicina apresentam mutações na região central do gene *rpoB* que codifica a subunidade beta da RNA polimerase. As mutações modificam a estrutura desta enzima, fazendo com que a RMP perca a capacidade de bloqueá-la, liberando a síntese de mRNA. A região que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, denominada *rifampicin resistance determining region* (RRDR) ou *hot spot*, possui 81 pares de base (27 códons) e é delimitada pelos códons 507 a 533 (Figura 4), o que facilita o diagnóstico molecular de resistência.^{11,12} As mutações mais frequentes nesta área ocorrem nos códons 526 e 531.^{13,14}

```

301                                     310                                     320
aag agc tcg tat ggc acc gga acc ggt aag gac gcg atc acc agc ggc atc gag gtc gta
Lys Ser Ser Ser Gly Thr Gly Thr Gly Lys Asp Ala Ile The Ser Gly Ser Glu Val Val
    
```

A marcação em negrito indica o códon 315 onde ocorre o maior número de mutações que produzem mudança do aminoácido agc serina por acc treonina e resistência à INH. Aminoácidos: Lys – lisina; Ser – serina; Gly – glicina; Thr – treonina; Asp – ácido aspártico, Ala – alanina; Ile – isoleucina; Glu – ácido glutâmico; Val – valina. O gene *katG* tem 2224 nucleotídeos. E 741 códons.

Figura 3 – Gene *katG*: códons de 301 a 320.

```

gcg atc aag gag ttc ttc ggc acc agc cag ctg agc caa ttc atg gac cag aac aac ccg
501                                     505                                     510                                     515                                     520
ctg tgc ggg ttg acc cac aag cgc cga ctg tgc ggc ctg ggg ccc ggc ggt ctg tca cgt
521                                     525                                     530 (Ser)                                     535                                     540
    
```

Os códons 507 e 533 (setas) delimitam a região *hot-spot*. O códon 531 (serina) é o que sofre maior número de mutações, que se traduzem em resistência à RMP.

Figura 4 – Pequena parte do gene *rpoB*.

Seqüenciamento de genes

O seqüenciamento do gene, para o diagnóstico de mutações, realiza-se com a reação de PCR, numa fase anterior, que delimita a região a ser analisada. A região delimitada produz uma seqüência de nucleotídeos, que é alinhada com a seqüência de referência para o *M. tuberculosis*, para a determinação das mutações e, conseqüentemente, da resistência específica a um fármaco. O seqüenciamento depende de aparelhos caros e a técnica é trabalhosa, embora os resultados sejam altamente confiáveis e possam ser utilizados como “padrão ouro” para o desenvolvimento de métodos de biologia molecular, para o diagnóstico de mutações de forma mais rápida e simples.

Testes rápidos em biologia molecular para o diagnóstico de mutações

O método INNO-LiPA Rif. TB é específico para a RMP e identifica as mutações mais comuns na RRDR.^{15,16} Os métodos *Genotype MTBDR Assay* e *Real-Time PCR* diagnosticam mutações tanto na RRDR quanto no códon 315 do gene *katG*.^{17,18,19} Estes métodos dependem

de kits, que também são de alto custo para uso em instituições públicas. O método MTBDR-plus é capaz de diagnosticar as mutações mais freqüentes nos genes *rpoB* e *katG*, e vem sendo recomendado pela Organização Mundial de Saúde por ser menos dispendioso e analisar 40 amostras simultaneamente. Mokrousov e colaboradores²⁰ utilizaram, em seu trabalho, a técnica de PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), que usa a enzima de restrição HAPII para diagnosticar a mutação no códon 315 (Serina AGC para Treonina ACC). Este método tem sido importante como um marcador de resistência para a INH, no noroeste da Rússia, por ser rápido, ter baixo custo, apresentar manipulação simples e ser fácil de interpretar. O método requer, apenas, aparelhagem padrão de PCR e de eletroforese. Novas pesquisas precisam ser realizadas para avaliar melhor esta técnica.

IS6110-RFLP

O IS6110-RFLP (restriction fragment length polymorphism) possibilita uma análise genotípica e, conseqüentemente, o entendimento da epidemiologia da tuberculose. A seqüência de inserção IS6110 está presente no genoma de muitas cepas do complexo *M.tuberculosis*, em um número variável de cópias. A análise por RFLP com o IS6110 provou ser um conveniente e confiável método para diferenciação de cepas de *M. tuberculosis*, sendo considerado o método de "padrão-ouro" na genotipagem molecular do *M. tuberculosis*, com um alto poder discriminatório.²¹

Resumidamente, esta técnica consiste na digestão das amostras isoladas de DNA, através de uma endonuclease de restrição. Esta enzima cliva o DNA em um sítio específico, e cada seqüência IS6110 apresenta apenas um sítio de restrição para esta enzima. Como esta seqüência apresenta-se em número variável e em múltiplas cópias no genoma do *M. tuberculosis*, o pa-

drão de bandas gerado pela digestão permitirá a divisão das amostras analisadas em *clusters*.

Método de Spoligotyping

A técnica de tipagem molecular pelo Spoligotyping é uma técnica baseada em PCR, com a possibilidade de utilização de menor quantidade de DNA. Este procedimento, além de ser mais rápido, facilita a investigação epidemiológica em tempo real, tornando mais rápida a tipagem molecular. O Spoligotyping, no qual avalia-se o polimorfismo presente no locus DR (Direct Repeat) encontrado exclusivamente no genoma das micobactérias do complexo *M. Tuberculosis*, tem sido utilizado em diversos estudos filogenéticos.²²

Uma particularidade do Spoligotyping é classificar as cepas de *M. tuberculosis* em determinadas famílias, de acordo com o padrão encontrado.²³ Através desta técnica, foram determinadas as famílias predominantes em nível mundial - Beijing, LAM (Latin-American and Mediterranean), Haarlem e T - sendo mais encontradas, na Ásia, as cepas Beijing e, na Europa e Américas, as cepas LAM.²⁴

PRA – PCR para identificação de espécies e subespécies de micobactérias

O PRA – PCR consiste na análise do padrão de restrição (PRA - Restriction Enzyme Pattern Analysis) de produtos da amplificação de um fragmento de 439 pares de bases do gene *hsp65*. Após a amplificação deste gene, é realizada a restrição dos fragmentos amplificados, através da digestão com as enzimas *BstII* e *HaeIII*. A interpretação do padrão de bandas gerado por esta digestão permite a identificação de espécies e subespécies de micobactéria. Esta técnica possui alta acurácia, sendo mais rápida e menos dispendiosa que a identificação fenotípica convencional, realizada por meio de reações químicas.

REFERÊNCIAS

- Baptista, I., Oelemann, M., et al. Drug resistance and genotypes os strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency vírus-infected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:1147-52.
- Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. 4ª ed. Brasília (DF): Fundação Nacional da Saúde; 1995.
- Rossetti ML, Valim AR, Silva MS, Rodrigues VS. Tuberculose resistente: revisão molecular. Rev Saúde Pública 2002;36(4):525-32.
- Höfling CC, Pavan EM, Giampaglia CMS, Ferrazoli L, Aily DCG, Albuquerque DM et al. Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. Int J Tuberc Lung Dis 2005;9(1):87-93.
- Rouse DA, DeVito JA, Li Z, Byer H, Morris SL. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis* effects on catalase-peroxidase activities and isoniazida resistance. Molecular Microbiology 1996;22(3):583-92.
- Ramaswami S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Update. Tuberc Lung Dis 1998;79(1):3-29.
- Slayden RA, Barry C. The genetic and biochemistry of isoniazida resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes and Infection 2000;2(6):659-69.
- Pyn AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission. Infection and Immunity 2002;70(9):4955-60.
- Slayden RA, Lee RE, Barry CE. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology 2000;38(3):514-25.
- Basso LA, Zhang R, Musser JM, Jacobs WR, Blanchard JS. Mechanisms of isoniazida resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization of enoiI reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. J Infect Dis 1998;178(3):769-75.
- Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Resp Res 2001;2(3):164-8.
- Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. Antimicrobial Agents Chemoth 2002;46(2):267-74.
- Mani N, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutation in *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

- clinical isolates from India. J Clin Microbiol 2001;39(8):2987-90.
14. Williams D, Waguespack C, Eisenach K. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(10):2380-6.
 15. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA RifTB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(10):2093-8.
 16. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen M, Soini H. Comparison of two commercially available DNA Line Probe Assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clinical Microbiology 2006;44(2):350-352.
 17. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clinical Microbiology 2006;44(7):2338-42.
 18. Viedma DG, Infantes MSD, Lasala F, Chaves 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;40(3):988-95.
 19. Hilleman D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the Geno Type MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. J Clin Microbiol 2007;45(8):2635-40.
 20. Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High prevalence of katG ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(5):1417-24.
 21. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin. Microbiol 1993;31:406-9.
 22. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35:907-14.
 23. Filii I, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. Emerg Infect Dis 2002;8:1347-9.
 24. Filii I, et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. J Clin Microbiol 2003;41:1963-70.