



PENDIDIKAN BERKESINAMBUNGAN PATOLOGI KLINIK 2018

MAKALAH LENGKAP

KLINIK

Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik 2018
Makalah Lengkap

Editor:

Ina S Timan

Dewi Wulandari

Xiii + 272 Halaman

15 x 21 cm

ISBN 978-602-5532-08-5

Diterbitkan pertama kali oleh

PIPInterna

Perkumpulan Informasi dan Penerbitan Interna
Gedung Cimandiri One, Lantai 3, Unit 302 Jl. Cimandiri No:1 -Cikini,
Jakarta Pusat 10330,
Tlp: 021-31903775.
Email: pipfkui@yahoo.com

Agustus 2018

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

Dilarang memperbanyak, mencetak, dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan bentuk apapun tanpa seizin penulis dan penerbit

DAFTAR ISI

kata Pengantar Ketua Panitia	iii
Sambutan Ketua Umum Perhimpunan	v
Daftar Kontributor	vii
Daftar Isi	xi
Peran Pemeriksaan Adenosin Deaminase sebagai Penanda Infeksi Tuberkulosis	1
Yusuf Bahasoan	
Penanda Sepsis: Status Terkini	19
July Kumalawati	
Pemeriksaan Berbasis Molekular pada Penyakit Infeksi	31
Dewi Wulandari	
Pendekatan Klinik Diare Kronik.....	45
Kaka Renaldi	
Diagnostik Laboratorium pada Diare Infeksi	47
Nuri Dyah Indrasari	
Analisa Tinja Pada Diare Non-Infeksi	70
Yusra	
Kekhususan Hematologi Pediatrik	90
Fify Henrika	
Peran Pemeriksaan Laboratorium dalam Kasus Pediatrik Hematologi- Onkologi.....	91
Murti Andriastuti	
Aplikasi Parameter Penelitian pada Alat Hematologi Otomatis.....	100
Ninik Sukartini	
Imunodefisiensi Kongenital dan Didapat	108
Farida Oesman	
Pemeriksaan Laboratorium pada Imunodefisiensi	124
Dewi Wulandari	
Pemeriksaan Biomolekuler dalam Tatalaksana Pasien Imunodefisiensi	134
Alida R. Harahap	
Patogenesis dan Diagnosis Laboratorik Sindroma Kardiorenal	143
Suzanna Immanuel	

Patogenesis dan Diagnosis Laboratorik Sindrom Kardiopulmonal	174
Sri Suryo Adiyanti	
Cardiorenal and Cardiopulmonal Syndrome Management.....	194
Eka Ginanjar	
Strategi Mencegah dan Mendeteksi Dini Masalah Gizi Balita di Indonesia	215
Damayanti Rusli Sjarif	
Pemeriksaan Asam Amino	217
Ina S. Timan	
Peran Insulin Like Growth Factor-1 dan Insulin Like Growth Binding Protein pada Stunting	230
Merci Monica Pasaribu	
Nefropati Diabetik: Patogenesis dan Pengobatan	242
Parlindungan Siregar	
Peran Eritrosit Dismorfik dan Renal Tubular Epithelial Cells (RTE) pada Diagnosis Nefropati Diabetik	247
Diana Aulia	
Kandungan Hemoglobin Retikulosit pada Penderita Gagal Ginjal Kronik dengan Hemodialisis	265
Riadi Wirawan	

PEMERIKSAAN BERBASIS MOLEKULAR PADA PENYAKIT INFEKSI

Dewi Wulandari

Departemen Patologi Klinik FKUI/RSCM

ABSTRAK

Perkembangan pemeriksaan molekular pada laboratorium mikrobiologi menawarkan pemeriksaan dengan sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik dibandingkan pemeriksaan mikrobiologi konvensional, serta memberikan hasil yang lebih cepat dan akurat. Kemajuan teknologi pemeriksaan berbasis molekular yang meliputi deteksi asam nukleat, kuantifikasi, dan analisis sekuens sangat membantu meningkatkan kemampuan diagnosis, tatalaksana, dan pemantauan berbagai penyakit infeksi. Metode diagnostik molekular ini terutama dipakai untuk menentukan pemberian tatalaksana pada pasien, memantau efektifitas terapi, dan mengidentifikasi strain yang berpotensi resisten terhadap pengobatan antimikroba.

Berdasarkan kompleksitas metodenya pemeriksaan molekular pada penyakit infeksi dapat dibedakan menjadi indentifikasi target tunggal, 2-3 target, multipleks, kuantitatif, genotyping, dan sequencing. Selain metode manual, saat ini sudah tersedia metode amplifikasi dan deteksi otomatis dengan ekstraksi terpisah, dan metode ekstraksi, amplifikasi, dan deteksi otomatis penuh. Namun demikian, sebagaimana pemeriksaan laboratorium lain, metode molekular juga membutuhkan validasi, kontrol kualitas, dan verifikasi hasil pemeriksaan yang baik.

Kata kunci: deteksi cepat, diagnostik molekular.

Pendahuluan

Penyakit infeksi masih menjadi masalah kesehatan utama di seluruh dunia, ditambah dengan munculnya penyakit infeksi baru (*emerging diseases*) dan kemunculan kembali penyakit infeksi yang pernah tereradikasi (*re-emerging diseases*), serta munculnya strain mikroorganisme yang resisten terhadap antimikroba. Pemeriksaan konvensional untuk mendeteksi etiologi penyakit infeksi umumnya berupa pemeriksaan berbasis biakan yang membutuhkan waktu lama, mempunyai sensitivitas rendah, dan dipengaruhi oleh pemberian antibiotika sebelum pengambilan sample. Selain itu, pemeriksaan serologi untuk mendeteksi antibodi, umumnya baru mulai terdeteksi pada akhir minggu pertama, dan seringkali sulit dibedakan dengan antibodi yang terbentuk dari infeksi sebelumnya. Sedangkan pemeriksaan serologi untuk mendeteksi antigen, tidak selalu tersedia.

Pemeriksaan berbasis molekular menawarkan pemeriksaan yang lebih cepat, dan memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang baik dibandingkan dengan teknik konvensional, terutama untuk agen infeksius yang sulit dideteksi dan diidentifikasi, *fastidious*, atau tidak dapat ditumbuhkan pada metode kultur berbasis pertumbuhan yang standar.(1) Pemeriksaan berbasis molekular pada penyakit infeksi pada umumnya berdasarkan deteksi asam nukleat (DNA atau RNA) agen infeksius dalam spesimen biologis. Secara umum pemeriksaan molekular terdiri dari tiga tahap, yaitu ekstraksi DNA/RNA, amplifikasi, dan

deteksi.

Pada umumnya asam nukleat target dalam sample biologis berjumlah sangat sedikit. Oleh karena itu, pada umumnya metode molekular menerapkan teknik amplifikasi, baik amplifikasi target maupun amplifikasi sinyal. Selanjutnya, untuk deteksi produk amplifikasi umumnya tidak lagi menggunakan elektroforesis agar, melainkan dengan metode hibridisasi *probe*, *sequencing*, atau teknik analisis luminex.(2)

Saat ini sudah tersedia berbagai kit komersial pemeriksaan berbasis molekular untuk berbagai penyakit infeksi. Teknologi yang ditawarkan meliputi deteksi agent infeksius penyebab penyakit infeksi, kuantifikasi, *genotyping*, dan deteksi mutasi gen yang berkaitan dengan resistensi obat antimikroba. Pada makalah ini akan diulas berbagai prinsip pemeriksaan molekular pada penyakit infeksi, aplikasi klinis dan pitfalls.

Prinsip dasar pemeriksaan molekular pada penyakit infeksi Kit

komersial untuk mendeteksi dan mengidentifikasi patogen infeksius telah meningkatkan derajat standarisasi dan mempermudah penggunaannya dalam laboratorium mikrobiologi klinis. Secara umum pemeriksaan molekular terdiri dari tiga tahap, yaitu tahap ekstraksi asam nukleat dari sample biologis, tahap amplifikasi, dan tahap identifikasi.

1

Ekstraksi asam nukleat

Ekstraksi asam nukleat merupakan tahap penting dalam pemeriksaan molekular. Keberhasilan proses ekstraksi akan menentukan keberhasilan pemeriksaan molekular. Keberhasilan proses ekstraksi sangat ditentukan oleh ketepatan memilih metode yang akan dipakai, sesuai dengan target asam nukleat yang akan diekstraksi (DNA atau RNA), dan sample biologis yang akan diperiksa.(3)(4)

Oleh karena pada umumnya asam nukleat berada di dalam sel, maka secara umum, teknik ekstraksi terdiri dari penghancuran sel atau jaringan, denaturasi kompleks nukleoprotein, inaktivasi enzim-enzim nuklease.(4) Ekstraksi asam nukleat dapat dikerjakan secara manual, namun saat ini juga sudah tersedia kit ekstraksi komersial, dan dapat dilakukan menggunakan alat otomatis. Ekstraksi asam nukleat bisa dilakukan secara kimiawi, berdasarkan pada sifat biokimiawi dari komponen sel, serta dapat dilakukan dengan menggunakan fase solid (*solid phase extraction/SPE*).(3)(4) Berbagai teknik ekstraksi kimiawi terangkum dalam tabel 1.

Tabel 1. Teknik ekstraksi dan purifikasi asam nukleat secara kimiawi(3)

Method	Advantage	Disadvantage
(1) GuSCN-phenol- chloroform extraction	High purity and yield of DNA or RNA	Hazardous chemicals
(2) Alkaline extraction	Fastest, reliable, and relatively easy procedure	Medium purity and fragmentation of genomic DNA
(3) CsCl gradient centrifugation with EtBr	High purity and yield of DNA or RNA	Laborious, costly and time consuming,
(4) Oligo(dT) cellulose chromatography	Fast protocol, good yield of mRNA recovery	Purification bias for mRNAs
(5) Chelex® extraction	Quick and simple protocol; no use of hazardous chemicals	Low purity of nucleic acids
(6) CTAB extraction	Efficient method for plant and other "hard to lyse" samples	Laborious, time-consuming; use of hazardous chemicals

GuSCN: guanidine thiocyanate, CsCl: Cesium chloride, EtBr: ethidium bromide, CTAB: cetyltrimethylammonium bromide

Teknik ekstraksi dengan fase padat (SPE) saat ini dianggap sebagai teknik yang paling efisien. Teknik ini berdasarkan fase cair dan fase padat yang akan secara selektif memisahkan analit dari larutan berdasarkan sifat hidrofobik, polar, dan ion dari zat terlarut dan pelarutnya. Setiap pelarut yang dipakai pada SPE akan memberikan karakteristik yang berbeda. Prinsip dasar ekstraksi dengan cara SPE ini adalah larutan garam dengan pH tertentu akan menyebabkan ikatan asam nukleat dengan partikel yang mengandung silika. Selanjutnya asam nukleat yang terikat fase padat ini akan dilepaskan melalui proses elusi asam nukleat.(3) Berbagai metode SPE yang tersedia saat ini, dengan kelebihan dan kekurangannya, terangkum dalam tabel 2.

2

Tabel 2. Berbagai metode ekstraksi asam nukleat dengan prinsip fase padat (SPE)(3)

Material	Molecule of affinity	Advantage	Disadvantage
(1) Silica matrices	DNA, RNA	High-purity DNA, easy to perform, and reproducible	Unable to recover small DNA fragments; one-time use
(2) Glass particles	DNA, protein	Simple, sensitive, and reproducible	High cost; requirement of equipment
(3) Diatomaceous earth	DNA, RNA	Reduced pipetting error, shorter protocol (less time and steps)	High cost
(4) Magnetic beads	DNA, RNA	No centrifugation, best choice for automation, virtually equipment-free	Interference in PCR amplification
(5) Anion exchange material	DNA, RNA	Reusable resins	Presence of high-salt concentrations
(6) Cellulose matrix	DNA, RNA	Easy to use and storage	Extraction protocols being complex and prone to error

Untuk mempermudah ekstraksi asam nukleat, terutama pada kit komersial dipakai beberapa perangkat (*device*) pembantu. Beberapa perangkat pembantu yang banyak dipakai tercantum dalam tabel 3.

Tabel 3. Perangkat pembantu ekstraksi asam nukleat.(3)

Material	Molecule of affinity	Advantage	Disadvantage
(1) Spin columns	DNA, RNA	Fast; reproducible	Aerosols cross-contamination; infrastructure and equipment required
(2) Beads or magnetic beads	DNA, RNA	Simple to use; high automation potential; equipment-free process	Labor intensive
(3) Automation (liquid handling robots)	DNA, RNA	Precise manipulation of sample and reagents, reducing losses and cost	High cost
(4) Microfluidics and "lab-on-a-chip" cartridges	DNA, RNA	Sensitive and specific	Incompatibility of common NAE chemicals

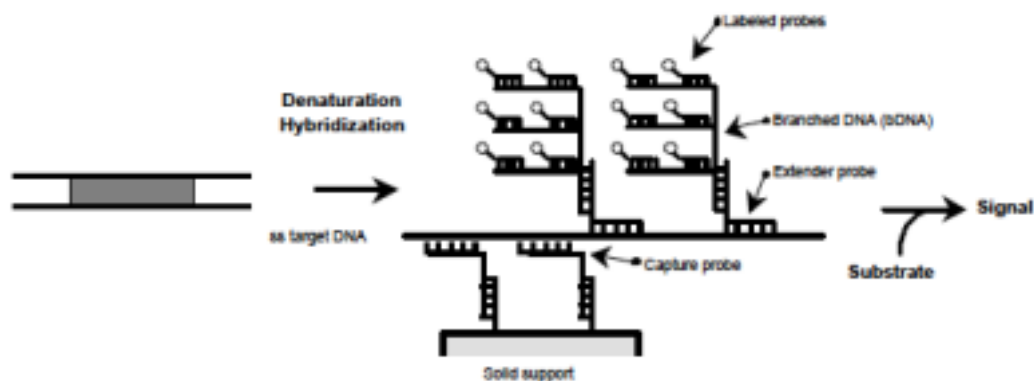
Tahap Amplifikasi

Pada umumnya asam nukleat target deteksi di sample biologis berada dalam jumlah sangat sedikit. Oleh karena itu, untuk dapat dideteksi perlu dilakukan amplifikasi. Amplifikasi bisa dilakukan pada asam nukleat target, atau pada sinyal dari probe yang melacak asam nukleat target tersebut.

1. Amplifikasi Sinyal

Teknik ini berdasarkan deteksi dan identifikasi langsung patogen dari sample dengan menggunakan pelacak (*probe*) asam nukleat. Pelacak ini dirancang sedemikian rupa, agar dapat berikatan secara komplementer dengan asam nukleat target. Salah satu contoh metode amplifikasi sinyal adalah *branched DNA*. Pada teknik bDNA dipakai DNA capture untuk menangkap DNA target. Selanjutnya ditambahkan probe berlabel yang terdiri dari DNA yang bercabang yang akan berikatan dengan DNA target yang sudah ditangkap oleh DNA capture. Sinyal dari label yang terikat pada probe yang akan dideteksi.(5)(Gambar 1.)

3



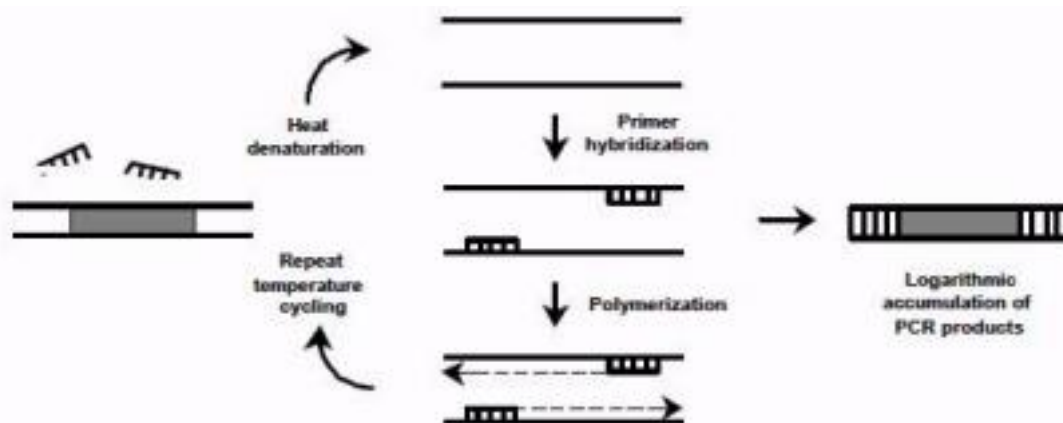
Gambar 1. Prinsip pemeriksaan *branched DNA*.

2. Amplifikasi target

Teknik amplifikasi target mempunyai kemampuan untuk memperbanyak asam nukleat target secara spesifik yang berada dalam jumlah sedikit pada sample hingga mencapai batas kemampuan deteksi. Oleh karena itu, teknik amplifikasi target mempunyai sensitivitas yang lebih baik dibandingkan teknik amplifikasi sinyal.(1)

Teknik amplifikasi target yang paling dikenal adalah *polymerase chain reaction (PCR)*. Teknik PCR terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi, annealing, dan polimerasi. Pada tahap denaturasi asam nukleat target yang berupa DNA untai

ganda akan dipisahkan menjadi untai tunggal dengan cara meningkatkan suhu hingga sekitar 94°C. Selanjutnya pada tahap *annealing* suhu diturunkan menjadi sekitar 60°C sehingga terjadi perlekatan *primer* ke *sequence* asam nukleat target. *Primer* adalah sepasang DNA untai tunggal pendek yang komplementer dengan kedua ujung DNA target, yang akan membatasi segmen DNA yang akan diamplifikasi. Tahap ketiga yaitu polimerisasi pada suhu 72°C, di mana ujung 3' primer akan diperpanjang sesuai dengan urutan DNA *template*-nya. Sehingga terbentuk 2 salinan DNA untai ganda. Siklus ini akan diulang, sehingga pada akhir siklus ke n akan terbentuk sebanyak 2^n salinan DNA. (2, 6) (Gambar 2)



Gambar 2. Prinsip pemeriksaan PCR.

4

Saat ini telah dikembangkan berbagai metode alternatif teknik amplifikasi asam nukleat, seperti *nucleic acid sequence based amplification (NASBA)*, *loop mediated isothermal amplification (LAMP)*, *self-sustained sequence replication (3SR)*, *rolling circle amplification (RCA)*.(7)

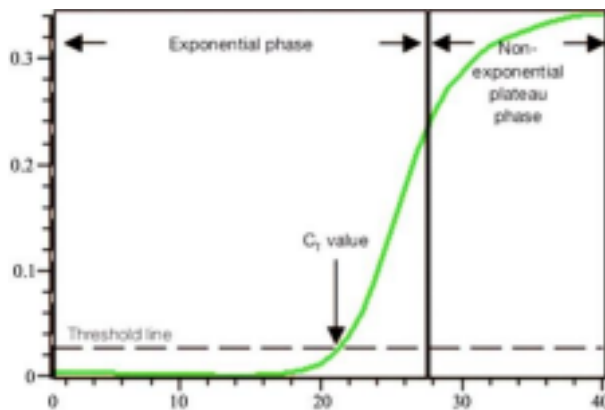
Teknik PCR sendiri telah mengalami berbagai modifikasi, antara lain metode *reverse transcription PCR (RT-PCR)* dan *real time PCR*. Metode RT-PCR dipakai untuk mendeteksi target berupa RNA, di mana RNA target akan terlebih dahulu dikonversi menjadi DNA komplementer (*complimentary DNA/cDNA*) sebelum dilanjutkan dengan teknik PCR. Sedangkan teknik real time PCR adalah teknik PCR yang mengintegrasikan probe yang memancarkan sinyal setiap akhir siklus, sehingga DNA produk bisa dideteksi *real-time* tidak perlu menunggu seluruh siklus selesai.(2)(7)(8)

Deteksi produk amplifikasi

Deteksi produk amplifikasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, pada saat proses masih berlangsung (*real-time*) atau setelah seluruh proses selesai. Deteksi di akhir proses bisa dilakukan dengan elektroforesis di gel agarose, dengan pewarnaan etidium bromida, dengan probe, dan lain-lain. Umumnya deteksi di akhir siklus amplifikasi memberikan hasil kualitatif.

Hasil pemeriksaan kuantitatif umumnya diperoleh dari pengukuran *real-time*. Pada real time PCR, detektor yang sering dipakai adalah sybergreen. Sybergreen adalah molekul yang hanya berikatan dengan DNA untai ganda, dan akan memancarkan fluoresensi jika dipaparkan dengan sumber eksitasi. Pada setiap akhir siklus PCR, di mana sybergreen akan berikatan dengan setiap DNA untai

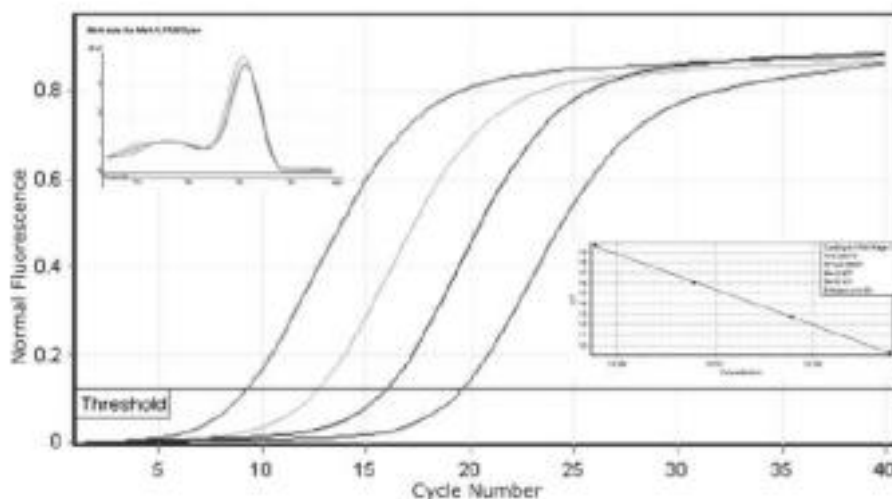
ganda yang dihasilkan dan memancarkan fluoresensi apabila disinari dengan sumber cahaya eksitasi. Intensitas yang terbentuk diukur oleh alat. Jumlah siklus yang diperlukan untuk menghasilkan intensitas fluoresensi yang dapat dideteksi disebut *cycle threshold (Ct)*.(2) (Gambar 3) Semakin banyak asam nukleat target di sample, semakin kecil siklus yang dibutuhkan untuk menghasilkan fluoresensi yang cukup. Dengan kata lain, semakin banyak asam nukleat target, maka semakin kecil nilai Ct.



Gambar 3. Grafik fluoresensi real time PCR

5

Untuk PCR kualitatif, nilai Ct dari sample di bandingkan dengan cut-off Ct yang telah ditentukan. Sedangkan untuk PCR kuantitatif Ct sample dibandingkan dengan kurva standar yang diperoleh dari sample standar dari berbagai konsentrasi yang telah diketahui.(2) (Gambar 4)



Gambar 4. Kurva standar pada real-time PCR.(9)

Pada pemeriksaan molekular kuantitatif ada dua istilah yang perlu diperhatikan, yaitu *limit of detection (LOD)* dan *limit of quantification (LOQ)*. *Limit of detection* adalah batas fluoresensi terendah yang mampu dideteksi oleh alat. LOD ini ditentukan oleh sensitivitas detektor yang dimiliki alat. Sedangkan LOQ adalah batas kemampuan alat untuk mengkonversi fluoresensi yang terjadi (nilai Ct) menjadi kadar asam nukleat target di dalam sample. LOQ ditentukan oleh larutan standar terendah yang dimiliki oleh sistem tersebut.

Aplikasi klinis

1. Diagnosis

Diagnosis merupakan aplikasi klinis terbanyak pemeriksaan molekular pada penyakit infeksi. Pemeriksaan molekular sangat membantu diagnosis terutama pada mikroba yang sulit ditumbuhkan dengan metode kultur standar (misalnya *Mycoplasma pneumoniae*), bersifat *fastidious* (misalnya *Bordetella pertussis*), atau pertumbuhannya sangat lambat (misalnya *Mycobacterium tuberculosis*), dan virus.(10)

Untuk penegakkan diagnosis penyakit infeksi, pemilihan sample merupakan salah satu kunci utamanya. Tidak semua patogen penyebab infeksi dapat dideteksi pada sample darah. Untuk dugaan infeksi pada susunan saraf pusat sample yang paling baik adalah cairan serebro spinal. Walaupun beberapa patogen penyebab juga dapat dideteksi di darah, namun sulit dipastikan apakah patogen tersebut penyebab infeksi intra kranial.(10)

Sample terbaik untuk dugaan infeksi pada saluran napas adalah sputum, cairan bilasan bronkus, atau swab tenggorok. Sedangkan untuk infeksi sistem gastrointestinal sample terbaiknya adalah tinja.(10)

6

2. Pemantauan Terapi

Saat ini pemeriksaan molekular kuantitatif yang dipakai sebagai pemantauan terapi dikenal dengan istilah *viral load*, karena terutama dipakai untuk berbagai infeksi virus seperti HIV, Hepatitis B, dan Hepatitis C, dan menggambarkan banyaknya virus di dalam sirkulasi.

Untuk pemantauan terapi pada infeksi HIV, perubahan target terapi yang diharapkan dilihat dari penurunan logaritmik jumlah *copy* RNA virus per ml darah. (log copy/ml). Saat ini pemantauan terapi HIV tidak lagi menggunakan hitung sel limfosit CD4, melainkan dengan pemeriksaan RNA HIV kuantitatif. Untuk infeksi hepatitis B dan hepatitis C target pengobatan adalah tidak terdeteksinya virus di dalam darah. Oleh karena itu, untuk kepentingan pelayanan pasien hepatitis B dan C, dibutuhkan sistem pemeriksaan molekular yang sangat sensitif, yang memiliki LOD serendah-rendahnya. Lebih baik jika nilai LOD tersebut sama dengan nilai LOQ. Akan tetapi jika LOD lebih rendah daripada LOQ, hasil yang terdeteksi di bawah LOQ harus tetap dilaporkan "terdeteksi < LOQ".

3. Identifikasi Resistensi Antimikroba

Pada uji resistensi antimikroba konvensional, mikroba ditumbuhkan di media yang mengandung antimikroba untuk mendeteksi adanya fenotipe resistensi antimikroba. Sedangkan pada uji resistensi antimikroba secara molekular berdasarkan deteksi mutasi genotipe mikroba yang membawa sifat resisten terhadap antimikroba tertentu.

Pada uji resistensi obat pada *M.tuberculosis* gen target utama yang dideteksi adalah gen yang mengkode resistensi pada rifampicin. Pada awalnya dianggap bahwa apabila terjadi resistensi pada rifampicin, maka besar kemungkinan juga terjadi resistensi pada INH dan pirazynamide. Oleh karena itu geneXpert TB yang dipakai oleh WHO hanya mendeteksi resistensi terhadap rifampicin

(*rpoB*). Namun ternyata, cukup sering terjadi mono resistensi terhadap INH, pirazinamid, dan obat lini pertama lain, yang jika tidak diterapi maka akan berkembang menjadi *multi drug resistance* atau *extended resistance*. Oleh karena itu, saat ini telah dikembangkan deteksi mutasi gen yang menyebabkan resistensi terhadap INH yaitu gen *katG*, dan *inhA* (Bioneer diagnostics) dan ethambutol (mutasi *embB*), streptomycin (mutasi pada *rpsL* dan *rrs*), serta fluoroquinolone (mutasi gen *gyrA*) dari QuanDX. (11)

Deteksi resistensi obat pada infeksi HIV juga terjadi akibat mutasi gen terutama yang dijadikan target pengobatan. Saat ini belum ada kit komersial untuk deteksi resistensi obat pada HIV. Namun berbagai senter sudah mengembangkan metode *home brew* untuk mendeteksi mutasi spesifik untuk masing-masing wilayah. Berbagai mutasi pada virus HIV yang berhubungan dengan resistensi obat dikelompokkan menjadi resistensi terhadap Protease inhibitor (PI), NRTI, NNRTI, dan INSTI. Begitu banyak variasi mutasi pada kelompok gen tersebut. WHO dan Stanford University menyediakan database untuk diunduh bagi peneliti yang berminat.(12)(13)

7

DAFTAR PUSTAKA

1. Pfaller MA. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: Practicality and costs. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):312–8.
2. Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21(1):102–11.
3. Ali N, Rampazzo RDCP, Costa ADiT, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int*. 2017;2017.
4. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009.
5. Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21:102–111.
6. Technologies ID. A Basic Polymerase Chain Reaction Protocol. *Integr DNA Technol*. 2011;1(1):1–4.
7. Fakruddin M, Mannan K Bin, Hossain M, Islam S, Mazumdar R, Chowdhury A, et al. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *J Pharm Bioallied Sci [Internet]*. 2013;5(4):245. Available from: <http://www.jpbonline.org/text.asp?2013/5/4/245/120066>
8. Cirillo DM. Nucleic Acids Amplification Tests. 2010;
9. Mendoza G, Portillo A, Olmos-Soto J. Accurate breast cancer diagnosis through real-time PCR her-2 gene quantification using immunohistochemically-identified biopsies. *Oncol Lett*. 2012;5(1):295–8.
10. Krishna NK, Cunnion KM. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. *Med Clin North Am [Internet]*. 2012;96(6):1067–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2012.08.005>
11. Zimenkov D V., Kulagina E V., Antonova O V., Zhuravlev VY, Gryadunov DA. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(6):1520–31.

12. Santos AF, Soares MA. HIV genetic diversity and drug resistance. *Viruses*. 2010;2(2):503–31.
13. Vi A, Vi RE, Fy W, Tdf IM, Fy RW, Zdv IM, et al. STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE Major HIV-1 Drug Resistance Mutations Major Non-Nucleoside RT Inhibitor (NNRTI) Resistance Mutations. 2017;3–4. Available from: https://hivdb.stanford.edu/assets/media/resistance_mutation-handout-Dec2017.b8f72e32.pdf