

تشخیص میکوباکتریوم توبرکولوزیس به روش PCR در نمونه‌های خلط که با روشهای معمول (گستره مستقیم، کشت و Bactec) منفی می‌شوند

سعید ریوندی، کارشناس ارشد باکتری‌شناسی
دکتر احمدرضا بهره‌مند، اهادار، عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران، بخش میکروبی‌شناسی
دکتر سپروس زینلی، عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

Diagnosis of Mycobacterium Tuberculosis by PCR Technique

ABSTRACT

In the present research work, a specific 285 bp DNA fragment was used for detection of Mycobacterium Tuberculosis complex. 100 samples were chosen randomly from sputum specimens that were negative with conventional methods (direct smear, culture, and radiometry), and examined by PCR; 7 cases of them were positive. Also, 20 sputum specimens were obtained from suspected patients to tuberculosis, and examined by three methods (culture, radiometry and PCR). The sensitivity of PCR compared with culture and radiometry was 100%, the specificity of PCR compared with culture was 91.66%, and compared with radiometry was 68.75%. Therefore, results of PCR revealed, this method is more sensitive, specific and rapid and it can detect ycobacterial infectious agents within one day period.

Key Words: PCR; Mycobacterium Tuberculosis; Diagnosis

مقدمه

سل، بیماری واگیردار و خطرناک بوده که شیوع آن گسترش جهانی دارد. به علت غفلت و بی‌توجهی جهانیان به این بیماری و شیوع سویه‌های مقاوم به درمان چند دارویی میکوباکتریومها از یک سو، و پیدایش و گسترش AIDS از سوی دیگر، عارضه سل از سال ۱۹۸۵ چهره‌گریه خود را در میان ملل مختلف، بدتر از گذشته نشان داده است. اکنون نه تنها ملل عقب‌مانده امریکای لاتین، افریقا و آسیا، بلکه مردم کشورهای صنعتی نیز در معرض تهاجم این بیماری بوده شیوع آن رو به افزایش است. بر اساس آمارهای سازمان جهانی بهداشت، سالانه ۸ میلیون مورد جدید بیماری گزارش می‌شود. این بیماری هر سال جان سه میلیون نفر را می‌گیرد. بیش از ۹۵٪ تلفات ناشی از سل، در کشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد و ۱/۴ از مرگ و میرهای ناشی از بیماریهای عفونی در افراد بالغ در جهان در اثر این بیماری است. بر اساس پیش‌بینی این سازمان در فاصله سالهای ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰، بیش از ۹۰ میلیون مورد جدید سل در دنیا بروز خواهد کرد و جان ۳۰ میلیون انسان را در کشورهای در حال توسعه

چکیده

در تحقیق حاضر برای تشخیص بیماری سل، از تکثیر ترادف ۲۸۵ جفت بازی خاص ژنوم مجموعه میکوباکتریوم توبرکولوزیس به وسیله PCR استفاده شد. از میان نمونه‌های خلط بیماران مشکوک به سل، که با روشهای معمول (گستره مستقیم، کشت و رادیومتری) منفی شده بودند، به طور تصادفی ۱۰۰ نمونه انتخاب، و با روش PCR آزمایش شد. ۷ مورد از این نمونه‌های منفی با PCR مثبت شدند. همچنین ۲۰ نمونه مشکوک به سل به سه روش کشت، رادیومتری و PCR آزمایش شد. در مقایسه نتایج بدست آمده، حساسیت PCR نسبت به کشت و Bactec ۱۰۰٪، ویژگی آن نسبت به کشت ۹۱/۶۶٪ و نسبت به Bactec ۶۸/۷۵٪ شد. با این روش عامل بیماریزا در عرض یک روز تشخیص داده شد. بنابراین، PCR به عنوان روشی سریع و کارآمد می‌تواند در تشخیص سل به کار رود.

واژه‌های کلیدی: میکوباکتریوم توبرکولوزیس؛ PCR

استفاده کردند. حساسیت PCR در تحقیق آنها در حد تشخیص ۵۰ پیکوگرم DNA در ژل حاوی اتیدیوم بروماید بود که با پروب نشاندار و روش هیبریداسیون، توانستند این مقدار را به ۱۰ فمتوگرم برسانند و برای تعیین ویژگی PCR، از ۱۰ میکوباکتری مختلف و ۸ گونه باکتریایی غیرهمجنس استفاده کردند که فقط PCR میکوباکتریوم توبرکولوزیس و م. فلهایمی مثبت شد (۱۴).

سوینی و همکارانش در سال ۱۹۹۲ از یک ژن کدکننده پروتئین ۳۲ کیلودالتونی برای تشخیص میکوباکتریوم توبرکولوزیس به روش PCR استفاده کردند. در مقایسه نتایج آن با نتایج کشت ۱۲۷ نمونه خلط، حساسیت PCR ۷۰/۴٪ و ویژگی آن با روش هیبریداسیون ۱۰۰٪ بود (۱۸).

روش و مواد

در تحقیق حاضر پرگنه استاندارد میکوباکتریوم توبرکولوزیس (H37Rv) در یک لیتر محیط کشت مایع بروک 7H9 کشت داده شد و مدت یک ماه در روی همزن خودکار در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از رشد کافی باکتری، محیط کشت مایع در لوله‌های ۵۰ میلی‌متری تقسیم و سانتریفوژ شدند؛ توده باکتری جمع‌آوری شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد تا به هنگام راه‌اندازی روش PCR مورد استفاده قرار گیرد

آغازگرها

بر اساس اطلاعات موجود (۲)، قطعه ASK58 که دارای ۹۵۹ جفت باز بوده و خاص DNAی مجموعه میکوباکتریوم توبرکولوزیس است، انتخاب شد و دو آغازگر ۲۴ جفت بازی برای ترادف ۲۸۵ جفت باز موجود روی این قطعه، در بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ساخته شد. ترادف این دو آغازگر به شرح زیر است:

5-CAAGGCTTCAATTCCGGTGATGCC-3 (آغازگر ۱)
5-TGGTCCGGTTCATACTCGGGCTGG-3 (آغازگر ۲)

تخلیص DNA

روشهای مختلف تخلیص DNA آزمایش شد (روش حرارت دادن و فریزر کردن؛ جوشاندن تنها؛ روش آنزیمی) و روش

خواهد گرفت (۱). بنابراین معضل سل، هم‌گریبانگیر کشورهای توسعه یافته و هم‌کشورهای در حال توسعه و عقب‌مانده است. در شیوع آن نه تنها شرایط اجتماعی، اقتصادی و فرهنگی (فقر، سوء تغذیه، کار زیاد و طاقت‌فرسا، تراکم جمعیت در هر خانواده، فقر بهداشتی، بی‌سوادی، جنگ، خشکسالیها، مسافرتها و مهاجرتها و ...) دخیل است، بلکه تشخیص اشتباه و درمان غیراختصاصی نیز نقش مهمی را دارند. بنابراین، تنها راه محافظت از افراد سالم جامعه، تشخیص سریع و درمان صحیح و کامل بیماران است. روشهای آزمایشگاهی معمول برای تشخیص سل، ۴ الی ۸ هفته طول می‌کشد. بخصوص در بیمارانی که عفونت سیستم عصبی مرکزی دارند، یا سیستم ایمنی آنها سرکوب شده است و به باسیل سل آلوده هستند، یک اقدام کلینیکی ستریح لازم است. استفاده از سیستم رادیومتریک (Bactec)، زمان تشخیص را به دو هفته کاهش می‌دهد، اما در مورد حساسیت و ویژگی آن مشکل وجود دارد (۱۵). آزمایش میکروسکوپی، روش استاندارد سریعی بوده، ولی تنها قادر است جنس باکتری را تعیین هويت نماید، ضمن این که باید حداقل 10^4 باسیل اسید نسبت در یک میلی‌لیتر نمونه باشد (۱۵،۶). در سالهای اخیر از یک سیستم بسیار حساس و ویژه، به نام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)^(۱) در تشخیص سل بهره می‌گیرند. در این روش با تکثیر ترادفهای خاص DNA، با استفاده از آغازگرهای^(۲) مناسب، امکان تشخیص بیماری در عرض یک روز فراهم می‌آید (۲، ۵، ۷، ۲۱)، به طوری که در سال ۱۹۹۲ آلتامیرانو و همکارانش برای تشخیص مجموعه میکوباکتریوم توبرکولوزیس در ۲۰۰ نمونه خلط به وسیله PCR، به حساسیت ۹۸٪ و ویژگی ۱۰۰٪ دست یافتند، ضمن اینکه توانستند حداقل ۲۰ باکتری را در نمونه تشخیص دهند (۲).

ایزناچ و همکارانش در سال ۱۹۹۱ از تکثیر یک قطعه ۱۲۳ جفت بازی مربوط به Is6110 برای تشخیص میکوباکتریوم توبرکولوزیس استفاده کردند. ۱۶۲ نمونه خلط را آزمایش کردند و بر اساس یافته‌های آنها، PCR نسبت به کشت بسیار حساستر است. آنها توانستند حداقل ۱۰ الی ۱۰۰ باکتری را در نمونه تشخیص دهند (۱۱).

در سال ۱۹۹۳ فورس و همکارانش در مطالعه خود، حساسیت و ویژگی PCR را در تشخیص میکوباکتریوم توبرکولوزیس ۸۷/۲٪ و ۹۷/۷٪ بدست آوردند (۱۲).

پورتیلو و همکارانش در سال ۱۹۹۱ از یک قطعه ۳۹۶ جفت بازی خاص ژنوم میکوباکتریوم توبرکولوزیس، به نام mtp40

مثبت، و حرکت اتیدیوم بر مایند از قطب مثبت به قطب منفی است؛ در نقطه‌ای اتیدیوم بر مایند، به پیوند فسفری قطعه DNA متصل شده و در زیر اشعه ماوراء بنفش به رنگ صورتی دیده می‌شود.

نتایج و بحث

در تحقیق حاضر از بیمارانی که علائم بالینی مشکوک به سل داشتند و برای آزمایش به بخش تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران مراجعه می‌کردند، در ظرفهای نمونه‌گیری سترون، نمونه خلط صبحگاهی گرفته شد. هر نمونه به دو قسمت تقسیم شد، به روش N- استیل-L-سیستین، یکنواخت^(۳) و با هیدروکسید سدیم ۰.۴٪ آلودگی‌زدایی^(۴) شد، سپس در دو محیط کشت لونشتاین جانسن دارای گلیسرول و لونشتاین بدون گلیسرول دارای پیرووات کشت داده شد و یک میلی‌لیتر از نمونه به ویال مخصوص Bactec تلقیح شد. دو گستره میکروسکوپی تهیه گردید، یکی از گستره‌ها به روش فلورسنت و دیگری به روش ذیل نلسن رنگ‌آمیزی شد؛ ویالهای Bactec هر روز با دستگاه شمارشگر رادیومتریکی بررسی شدند. از نمونه‌های جمع‌آوری شده که نتیجه گستره مستقیم، کشت و Bactec آنها منفی بود، به طور تصادفی ۱۰۰ نمونه انتخاب، و به روش PCR آزمایش گردید و نتیجه PCR ۷ نمونه از نمونه‌های مذکور مثبت شد؛ علت منفی بودن این نمونه‌ها در محیط کشت ممکن است در اثر از دست رفتن باکتریها در فرآیند آلودگی‌زدایی، و یا آسیب وارده از این فرآیند به ساختمان باکتری، و یا مرگ آن در اثر درمان دارویی بوده است.

در ضمن، از ۲۰ فرد مشکوک به بیماری سل، نمونه خلط صبحگاهی گرفته شد و به روش کشت، Bactec و PCR آزمایش شد؛ از ۲۰ نمونه فوق، ۱۱ مورد با هر سه روش آزمایش منفی شدند؛ از ۹ نمونه باقیمانده، هر ۹ مورد با PCR، ۸ مورد با کشت و ۵ مورد با Bactec مثبت شد. در مقایسه نتایج بدست آمده، حساسیت PCR نسبت به کشت و Bactec ۱۰۰٪ و ویژگی آن نسبت به کشت ۹۱/۶۶٪ و نسبت به Bactec ۶۸/۷۵٪ شد. همچنین برای تعیین ویژگی PCR، DNAهای ۱۴ گونه مختلف میکوباکتریوم و ۱۲ گونه باکتریهای دیگر به روش آنزیمی تخلیص، و به روش PCR آزمایش شد (اسامی گونه‌های باکتریایی مورد

آنزیمی (۳) مناسبتر از روشهای دیگر تشخیص داده شد. در این روش، توده باکتری در بافر تریس هیدروکلرید با $\text{pH} = 8$ (پودر تریس هیدروکلرید ۱۰ میلی‌مول، EDTA یک میلی‌مول) به صورت سوسپانسیون درآمد و تعداد باکتری در سوسپانسیون، با استفاده از روش کدورت سنجی مک‌فارلند مشخص شد (۴). یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری را در لوله میکروفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته بعد از سانتی‌فیوژ در ۱۲۰۰۰ دور، مایع رویی دور ریخته شد. بر روی رسوب ۵۶۷ میکرولیتر بافر تریس، ۳ میکرولیتر پروتیناز K- (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ۳۰ میکرولیتر دودسیل سولفات سدیم اضافه شد و یک ساعت در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا دیواره باکتریها لیز شد؛ سپس به وسیله فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل (۲۵ : ۲۴ : ۱) پروتیناز K- و دترجنت از محیط خارج شدند و با اتانول، DNA رسوب داده شد و بعد از خارج کردن اتانول، رسوب در بافر تریس حل شد و در واکنش PCR به عنوان DNAی هدف بکار رفت (۳).

فرآیند PCR

یک مخلوط واکنش PCR با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل تریس هیدروکلرید با (۸ pH)، ۵ میلی‌مول، کلرور پتاسیم ۱۰ میلی‌مول، کلرور منیزیم ۱/۵ میلی‌مول، از هر کدام از آغازگرها ۳۲۰ نانومول، DNAی هدف ۰/۱ میکروگرم، چهار نوع داکسی‌ریبونوکلوئوزید سه فسفات، از هر کدام ۲۰۰ میکرومول، ژلاتین ۰/۰۱٪، DNA-Taq پلیمرز یک واحد، روغن معدنی ۲۵ میکرولیتر (برای جلوگیری از تبخیر محلول در دمای بالای مورد نیاز برای دناتوراسیون) آماده شد.

برنامه دستگاه چرخه حرارتی^(۱)

دمای باز شدن دو رشته DNA، 94°C به مدت سه دقیقه، دمای اتصال آغازگرها به قطعه هدف 53°C به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر 72°C به مدت ۱ دقیقه، دمای باز شدن رشته‌ها 94°C به مدت ۱ دقیقه، تکرار از مرحله ۳ به تعداد ۳۵ دور، دمای اتصال آغازگرها 50°C به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر نهایی 72°C به مدت ۴ دقیقه بود. بعد از اتمام برنامه، بر روی محصول بدست آمده بافر سنگین کننده^(۲) ریخته و مخلوط در روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد؛ شاهد‌های مثبت و منفی و شناساگر نیز بکار برده شدند. برای رؤیت باند ایجاد شده، از اتیدیوم بروماید استفاده شد، زیرا حرکت قطعه تکثیر شده DNA در میدان الکتریکی، از قطب منفی به سوی قطب

1- Thermal cycler

2- Loading buffer

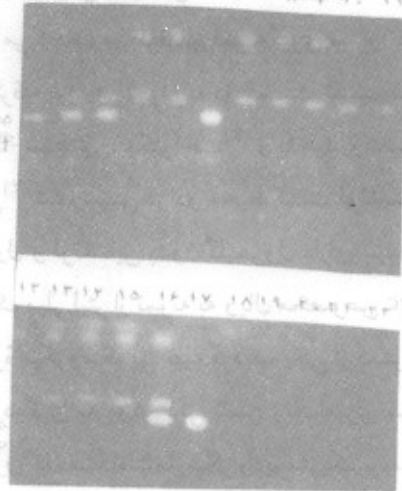
3- Homogenization

4- Decontamination

آزمایش در جدول آمده است).

در این آزمایش مجموعه میکوباکتریوم توبرکولوزیس با آغازگرهای مذکور مثبت شدند که این امر نشاندهنده اختصاصی بودن قطعه تکثیر شده برای م. توبرکولوزیس بود.

شکل ۱- تعیین ویژگی آغازگرها



در این تصویر ویژگی آغازگرهای مورد نظر را در برابر DNAهای ۱۴ گونه مختلف میکوباکتری نشان می دهد. همانطور که انتظار می رفت، آغازگرها تنها به DNAهای مجموعه م. توبرکولوزیس چسبیده و در انجام PCR، باند مربوط به قطعه ۲۸۵ جفت باز تولید شد. ستونهای ۱، ۲ و ۳ مربوط به واکنش م. توبرکولوزیس، م. بوویس و م. بوویس ب ت ژ است. ستونهای ۶ و ۱۷ شناساگر ۲۸۵ جفت بازی است. ستون ۱۶ شاهد مثبت است. باندهای بالاتر از باند ۲۸۵ جفت باز مربوط به کنترل های داخلی است که شرایط مساعد PCR را در هر تیوب نشان می دهد.

در ادامه آزمایشهای انجام شده، برای تعیین حساسیت PCR با استفاده از لوله های کدورت سنجی مک فارلند، سوپانسیون باکتری در بافر تریس تهیه شد و به روش PCR آزمایش گردید و تا حدود ۳۰ باکتری قابل تشخیص بود البته این تعداد به علت حالت توده بودن میکوباکتریومها، که حتی با بهم زدن شدید نیز به طور کامل از هم جدا نمی شوند، یک عدد نسبی است و اگر از شناساگر نشاندار (۱) برای شناسایی محصول PCR استفاده شود قدرت تشخیص به حد یک باکتری می رسد (۲).

در ضمن معلوم شد که فرآیند آلودگی زدایی با N- استیل -L- سیستین اثر ممانعت کنندگی بر واکنش PCR دارد، به همین دلیل، در این تحقیق برای یکنواخت کردن نمونه و از بین بردن حالت موکوتیدی به روی آن به اندازه نمونه، بافر تریس ریخته شد و با تکان دهنده الکتریکی به شدت بهم زده شد تا نمونه یکنواخت شود.

جدول ۱- اسامی گونه های مختلف میکوباکتریومها و نتیجه آزمایش

PCR آنها برای تعیین ویژگی PCR

نتیجه PCR	نام گونه باکتری نتیجه PCR
+	۱- میکوباکتریوم توبرکولوزیس
+	۲- میکوباکتریوم بوویس
+	۳- میکوباکتریوم بوویس ب ت ژ
-	۴- میکوباکتریوم تر مورزیستیل
-	۵- میکوباکتریوم فور ثوایتوم
+	۶- شناساگر
-	۷- میکوباکتریوم چلونه
-	۸- میکوباکتریوم کانزاسی
-	۹- میکوباکتریوم واکا
-	۱۰- میکوباکتریوم آویوم کمپلکس
-	۱۱- میکوباکتریوم اسکر و فولاسنوم
-	۱۲- میکوباکتریوم فلاوسنس
-	۱۳- میکوباکتریوم تریویال
-	۱۴- میکوباکتریوم گورده
-	۱۵- میکوباکتریوم زولگه ای
+	۱۶- میکوباکتریوم توبرکولوزیس
+	۱۷- شناساگر

جدول ۲- اسامی سایر گیرنده های باکتری مورد استفاده

نتیجه PCR	نام گونه باکتری
-	۱- گونه اشرشیاکلی
-	۲- گونه بروسلا
-	۳- گونه هموفیلوس
-	۴- گونه کلبسیلا پنومونیه
-	۵- گونه استافیلوکوک اورئوس
-	۶- گونه استافیلوکوک کوکولاز منفی
-	۷- گونه استرپتوکوک ویریدانس
-	۸- گونه استرپتوکوک پیورنس
-	۹- گونه پنوموکوک
-	۱۰- گونه پروتئوس
-	۱۱- گونه پseudomonas اثرورینوزا
+	۱۲- گونه میکوباکتریوم توبرکولوزیس
+	۱۳- شناساگر

بنابر نتایج حاصله، روش PCR به عنوان روشی با حساسیت و ویژگی بالا و توان تشخیص بسیار سریع می تواند در تشخیص عامل عفونت بکار رود؛ به طوری که با این روش می توان در عرض یک روز نتیجه آزمایش بیمار را معلوم کرد و از اتلاف وقت و صرف

هزینه‌های بیمارستانی و درمان نادرست جلوگیری کرد.

منابع

- ۱- بهداشت جهان؛ تهران؛ انتشارات مرکز نشر دانشگاهی؛ سال نهم؛ شماره اول؛ تابستان ۱۳۷۳؛ ۶۰ صفحه.
- 2- Altamirano Manuel, Michael T. Kelly, Alfred Wong, Elaine T. Bassuille, William A. Black, and John A. Smith 1992. Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J. Clin. Mic.* 30(8): 2173-76.
- 3- Ausubel Frederik, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith and Kevin Struhi; 1987. *Current protocols*; published by Greens publishing associates and Wiley - Interscience; 2.1.1. - 2.1.2.
- 4- Baron E. Jo, Sydney M. Finegdd; 1990. *Diagnostic microbiology*; 8th edition; published by C.V. Mosby company; in U.S.A; 597-640.
- 5- Boddinhaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blocker, and E.C. Bottger. 1990. Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of rRNA. *J. Clin. Mic.*; 28: 1751-59.
- 6- Boyd. Jc Marr JJ; 1975. Decreasing reliability of acid fast smear techniques for deection of tuberculosis; *Ann. Intern. Med*; 82: 489-92.
- 7- Brissonoe A., D. Lecossier, X. Nassif, B. Gicquel, V. Levy Frebault, and A.J. Hance.; 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of *Mycobacterial* DNA in clinical samples. *Lancet ii*: 1069-71.
- 8- Buck George E., Lila C.O, Hara, and james T. Summergill; 1990. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J. Clin. Mic.*; 30(5): 1331-1334.
- 9- Cousins D.V., S.D. Witton, and B.R. Francis. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*; *Vet. Micro*; 27: 187-195
- 10- Cousins D.V., Stephen D. Witton, Barry R. Francis and Beth L. Gow; 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis; *J. Clin. Mic, Jan.*; 30(1): 255-258.
- 11- Eisenach K.D., M., D. Cave, J. H. Bates, and J.T. Crawford; 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tubersulosis*; *J. Infect. Dis.*; 161: 977-981.
- 12- Forbes B.A. and karen E.S. Hicks; 1993. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction; *J. Clin. Mic.*; July; 31(7): 1688-94.
- 13- Manjunath N., P. Shankar, L. Rajan, A. Bhargava, S.Saluja, and Shrinivas; 1991. Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis; *Tubercle* 72: 21-27.
- 14- Portillo D.P., L.A. Murillo, and M.E. Patarroyo, 1991. Amplification of a species - specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis; *J. Clin. Mic.*; 29: 2163-68.
- 15- Ralphs N.T., S. Garrett, R. Morse, J. B. Cookson, P.W. Andrew, and G.J. Boulnois; 1991. A DNA primer probe system for the rapid and sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogens; *J. Appl. Bacteriol.*; 70: 221-226.
- 16- Shawar R.M., Fouad A. K.El - Zaatari, Arun Nataraj, and Jill E. Clarridge; 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two - step polymerase chain reaction and nonisouopic hybridization methods; *J. Clin. Mic.*; Jan. 31(1): 61-65.
- 17- Sjobring V.M. Mecklenburg, A.B. Andersen, and H. Miorner; 1990. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*; *J. Clin. Mic*; 28: 2200-2204.
- 18- Soini Hanna, Mikael Skurnik, karilippo, Eero Tala, and Matti K. Vilijanen; 1992. Detection and identification of *Mycobacterium* by amplification of a segment of the gene coding for the 32 kilo dalton protein; *J. Clin. Mic.*; 30(8): 2025-28.
- 19- Tanil kocagoz, Engin Yilmaz, Seref Ozkara, Sexin kocagoz, Murat Hayran, Meena Sachedeva, and Henry F. Chambers. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure; *J. Clin. Mic.*; 31(6): 1435-38.
- 20- Wit D., L. Steyn, S. Shoemaker, and M. Sogin; 1990. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification; *J. Clin. Mic.*; 28: 2437-41.
- 21- Wit D., G. Maartens, L. Steyn; 1992. A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculosis pleural effusion; *Tubercle and lung disease*; 73: 262-267.