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

سعید ریوندی، کارشناس ارشد باکتری‌شناسی
دکتر احمدرضا بهره‌مند، استادیار، عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران، بخش میکروبشناسی
دکتر سیروس 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

چکیده

در تحقیق حاضر برای تشخیص بیماری سل، از تکثیر ترادف ۲۸۵ جفت بازی خاص ژنوم مجموعهٔ میکوباکتریوم توبرکولوزیس به وسیله PCR استفاده شد. از میان نمونه‌های خلط بیماران مشکوک به سل، که با روشهای معمول (گسترهٔ 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 نمونهٔ 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

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 چهرهٔ کریه خود را در میان ملل مختلف، بدتر از گذشته نشان داده است. اکنون نه تنها ملل عقب‌ماندهٔ 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 $\frac{1}{4}$ از مرگ و میرهای ناشی از بیماریهای عفونی در افراد بالغ در جهان در اثر این بیماری است. بر اساس پیش‌بینی این سازمان در فاصلهٔ 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

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

خواهد گرفت(۱). بنابراین معضل سل، هم گریبانگیر کشورهای توسعه یافته و هم کشورهای در حال توسعه و عقب‌مانده است. در شیوع آن نه تنها شرایط اجتماعی، اقتصادی و فرهنگی (فقر، سوءتغذیه، 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 سریع 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 هویت 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 پلیمراز (PCR)[1] در تشخیص سل بهره می‌گیرند. در این روش با تکثیر ترادفهای خاص DNA، با استفاده از آغازگرهای[2] مناسب، امکان تشخیص بیماری در عرض یک روز فراهم می‌آید(۲۱-۲،۵،۷)، به طوری که در سال ۱۹۹۲ آلتامیرانو و همکارانش برای تشخیص مجموعهٔ 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 فوربس 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 قطعهٔ ۳۹۶ جفت بازی خاص ژنوم میکوباکتریوم توبرکولوزیس، به نام mtp40 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 گونهٔ باکتریایی غیرهمجنس استفاده کردند که فقط PCR میکوباکتریوم توبرکولوزیس و م. فله‌ایی مثبت شد(۱۴).

سوینی و همکارانش در سال ۱۹۹۲ از یک ژن کدکنندهٔ پروتئین ۳۲ کیلودالتونی برای تشخیص میکوباکتریوم توبرکولوزیس به روش PCR استفاده کردند. در مقایسهٔ 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 پرگنهٔ استاندارد میکوباکتریوم توبرکولوزیس (H37Rv) در یک لیتر محیط کشت مایع میدل بروک 7H9 کشت داده شد و مدت یک ماه در روی همزن خودکار در گرمخانهٔ ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از رشد کافی باکتری، محیط کشت مایع در لوله‌های ۵۰ میلی‌متری تقسیم و سانتریفوژ شدند؛ تودهٔ 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 مجموعهٔ میکوباکتریوم توبرکولوزیس است، انتخاب شد و دو آغاگر 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 (آغازگر۱)

5-TGGTCCGGTTCATACTCGGGCTGG-3 (آغازگر۲)

تخلیص DNA

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

1- Polymerase chain reaction 2- Primers

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

آنزیمی(۳) مناسبتر از روشهای دیگر تشخیص داده شد. در این روش، توده باکتری در بافر تریس هیدروکلرید با pH = ۸ (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 سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دور، مایع رویی دور ریخته شد. بر روی رسوب ۵۶۷ میکرولیتر بافر تریس، ۳ میکرولیتر پروتئیناز -K (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ۳۰ میکرولیتر دودسیل سولفات سدیم اضافه شد و یک ساعت در بن‌ماری ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا دیوارهٔ باکتریها لیز شد؛ سپس به وسیله فنل ـ کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل (۲۵ : ۲۴ : ۱) پروتئیناز ـ 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 (pH ۸)، ۵ میلی‌مول، کلرور پتاسیم ۱۰ میلی‌مول، کلرور منیزیم ۱/۵ میلی‌مول، از هرکدام از آغازگرها ۳۲۰ نانومول، DNAی هدف ۰/۱ میکروگرم، چهار نوع داکسی‌ریبونوکلئوزید سه فسفاته، از هر کدام ۲۰۰ میکرومول، ژلاتین ۰/۰۱٪، DNA-Taq پلیمراز یک واحد، روغن معدنی ۲۵ میکرولیتر (برای جلوگیری از تبخیر محلول در دمای بالای مورد نیاز برای دناتوراسیون) آماده شد.

برنامهٔ دستگاه چرخهٔ حرارتی[1]

دمای باز شدن دو رشتهٔ DNA، ۹۴ °C به مدت سه دقیقه، دمای اتصال آغازگرها به قطعهٔ هدف ۵۳ °C به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه،دمای باز شدن رشته‌ها ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، تکرار از مرحله ۳ به تعداد ۳۵ دور، دمای اتصال آغازگرها ۵۰ °C به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر نهایی ۷۲ °C به مدت ۴ دقیقه بود. بعد از اتمام برنامه، بر روی محصول بدست آمده بافر سنگین کننده[2] 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 قطعهٔ تکثیر شدهٔ DNA در میدان الکتریکی، از قطب منفی به سوی قطب مثبت، و حرکت اتیدیوم برماید از قطب مثبت به قطب منفی است؛ در نقطه‌ای اتیدیوم برماید، به پیوند فسفری قطعهٔ DNA متصل شده و در زیر اشعهٔ 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، نمونهٔ خلط صبحگاهی گرفته شد. هر نمونه به دو قسمت تقسیم شد، به روش N- استیل -L- سیستئین، یکنواخت[3] و با هیدروکسید سدیم ۴٪ آلودگی‌زدایی[4] 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 گسترهٔ میکروسکوپی تهیه گردید، یکی از گستره‌ها به روش فلورسنت و دیگری به روش ذیل نلسن رنگ‌آمیزی شد؛ ویالهای Bactec هر روز با دستگاه شمارشگر رادیومتریک بررسی شدند. از نمونه‌های جمع‌آوری شده که نتیجهٔ گسترهٔ 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 نمونهٔ باقیمانده، هر ۹ مورد با PCR، ۸ مورد با کشت و ۵ مورد با Bactec مثبت شد. در مقایسهٔ 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

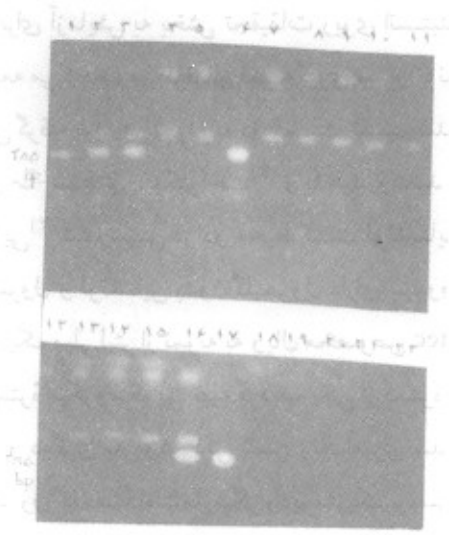
1- Thermal cycler
2- Loading buffer
3- Homogenization
4- Decontamination

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

آزمایش در جدول آمده است).

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

شکل ۱ـ تعیین ویژگی آغازگرها



در این تصویر ویژگی آغازگرهای مورد نظر را در برابر DNAهای ۱۴ گونه مختلف میکوباکتری نشان می‌دهد. همانطور که انتظار می‌رفت، آغازگرها تنها به DNAهای مجموعهٔ 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 ث 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 کنترلهای داخلی است که شرایط مساعد PCR را در هر تیوب نشان می‌دهد.

در ادامه آزمایشهای انجام شده، برای تعیین حساسیت PCR با استفاده از لوله‌های کدورت سنجی مک‌فارلند، سوپانسیون باکتری در بافر تریس تهیه شد و به روش PCR آزمایش گردیدو 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 نمی‌شوند، یک عدد نسبی است و اگر از شناساگر نشاندار[1] برای شناسایی محصول PCR استفاده شود قدرت تشخیص به حد یک باکتری می‌رسد(۲).

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

جدول ۱ـ اسامی گونه‌های مختلف میکوباکتریوم‌ها و نتیجه آزمایش PCR آنها برای تعیین ویژگی PCR

نام گونهٔ باکتری	نتیجه PCR
۱ـ میکوباکتریوم توبرکولوزیس	+
۲ـ میکوباکتریوم بوویس	+
۳ـ میکوباکتریوم بوویس ب ث ژ	+
۴ـ میکوباکتریوم ترمورزیستیبل	—
۵ـ میکوباکتریوم فورتوایتوم	—
۶ـ شناساگر	+
۷ـ میکوباکتریوم چلونه	—
۸ـ میکوباکتریوم کانزاسی	—
۹ـ میکوباکتریوم واکا	—
۱۰ـ میکوباکتریوم آویوم کمپلکس	—
۱۱ـ میکوباکتریوم اسکروفولاسئوم	—
۱۲ـ میکوباکتریوم فلاوسنس	—
۱۳ـ میکوباکتریوم تریوبال	—
۱۴ـ میکوباکتریوم گوردنه	—
۱۵ـ میکوباکتریوم زولگه‌ای	—
۱۶ـ میکوباکتریوم توبرکولوزیس	+
۱۷ـ شناساگر	+

جدول ۲ـ اسامی سایر گیرنده‌های باکتری مورد استفاده

نام گونه باکتری	نتیجه PCR
۱ـ گونه اشرشیاکلی	—
۲ـ گونه بروسلا	—
۳ـ گونه هموفیلوس	—
۴ـ گونه کلبسیلا پنومونیه	—
۵ـ گونه استافیلوکوک اورئوس	—
۶ـ گونه استافیلوکوک کوگولاز منفی	—
۷ـ گونه استرپتوکوک ویریدانس	—
۸ـ گونه استرپتوکوک پیوژنس	—
۹ـ گونه پنوموکوک	—
۱۰ـ گونه پروتئوس	—
۱۱ـ گونه پسودوموناس انروژینوزا	—
۱۲ـ گونه میکوباکتریوم توبرکولوزیس	+
۱۳ـ شناساگر	+

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

1- Lebeled marker

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

هزینه‌های بیمارستانی و درمان نادرست جلوگیری کرد.

منابع

۱. بهداشت جهان؛ تهران؛ انتشارات مرکز نشر دانشگاهی؛ سال نهم؛ شمارهٔ 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 Wileg - 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- Boddinghaus, 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- Brissonoel 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 Shriniwas; 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]