

بررسی مقایسه ای دو روش Slit skin smear و PCR در تشخیص

مایکوباکتریوم لپر در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بابا باغی تبریز

پیمان آذغانی^۱، دکتر علیرضا سمر باف زاده^۲، دکتر احمد فرج زاده شیخ^۳، دکتر فرانسوا فیوال^۴، دکتر علیرضا خرمی فر^۴

^۱نویسنده مسوول: دانشجوی باکتری شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل E-mail: Paymanazghani@yahoo.com
^۲دانشیار ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز
^۳دانشیار میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اهواز
^۴پزشک عمومی

چکیده

زمینه و هدف: مایکوباکتریوم لپر عامل بیماری جذام می باشد که یک بیماری مسری است که در اغلب کشورهای در حال توسعه دیده میشود. این بیماری بسبب ایجاد علایم بالینی ناخوشایند و ناتوانیهای که ایجاد میکند نام آن همواره با ترس و وحشت همراه بوده است. بیشترین زمان تقسیم را در بین باکتریها دارد (۱۴-۱۲ روز). دوره کمون آن طولانی بوده و ۴۰ سال هم گزارش شده است. اثرات باقیمانده از بیماری حاصله (جذام) غیر قابل برگشت بوده و بار روانی و اجتماعی سنگینی بر فرد و اجتماع دارد سازمان بهداشت جهانی ۹۱ کشور را در لیست مناطقی قرار داده است که جذام هنوز هم در این کشورها یک مشکل میباشد. هدف اصلی این تحقیق تشخیص زود هنگام و دقیق بیماری قبل از بروز علایم بالینی ناخوشایند و نه دینه کردن روش مولکولی PCR بجای روش قدیمی Slit skin smear است که روش دقیق و قابل اعتمادی نمی باشد.

روش کار: در این تحقیق از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بابا باغی با تیغ جراحی از نرمه گوشها و ابروها نمونه برداری شده (Slit Skin) و پس از تهیه گسترش بر روی لام رنگ آمیزی اسید فست شده و بررسی میکروسکوپی شدند. همزمان با بررسی میکروسکوپی نمونه بیوپسی نیز از بیماران برداشته شد تا با PCR نیز تشخیص داده شوند.

یافته ها: از ۴۰ نمونه Slit Skin تنها ۳ نمونه (۷/۵٪) لام مسقیم مثبت داشتند که تشخیص آنها فرم LL بوده است. در حالیکه از ۴۰ نمونه بیوپسی ۱۴ مورد (۳۵٪) با روش PCR نتیجه مثبت داشتند. بقیه ۱۱ مورد مثبت احتمالاً به فرم TT یا فرمهای بینابینی (BB, BT, BL) مبتلا بوده اند.

نتیجه گیری: در این تحقیق مشخص شد که روش لام مستقیم با رنگ آمیزی اسید فست روش دقیق و مطمئنی برای تشخیص بیماری جذام نمی باشد بویژه در فرم TT که همیشه لام مستقیم منفی است. همچنین روش لام مستقیم و علایم بالینی در تخمین میزان شیوع بیماری نیز روش دقیق و مطمئنی نمی باشد.

واژه های کلیدی: توبرکولویید، توبرکولویید، لیروماتوز لیروزی، PCR، لیروزی، بابا باغی، اسلیت اسکین اسمیر، مایکوباکتریوم لپر

پذیرش: ۸۶/۲/۱۰

دریافت: ۸۵/۷/۱۹

مقدمه

باکتری عامل سل یک باکتری اسید فست می باشد یعنی در برابر خاصیت رنگ بری اسید لکل مقاومت می کند که این خصوصیت بخاطر وجود Mycolic acid در دیواره سلولی باکتری می باشد. میزان اسید فست بودن این باکتری نسبت به باکتری عامل سل بیشتر

بیماری جذام یک بیماری مسری نسبتاً شایع در کشورهای جهان سوم و کشورهای در حال توسعه می باشد. عامل بیماری Mycobacterium leprae می باشد که یک باکتری داخل سلولی اجباری و غیر قابل کشت در محیط های کشت مصنوعی بوده و همانند

تر از نوع لپروماتوز بوده و تظاهرات با لینی اشاره شده یک طرفه می باشد. در فرم LL ظهور بیماری، حاصل Anergy سیستم ایمنی بدن بوده و نسبت سلول های CD-8+/CD-4+ 2:1 می باشد. یعنی سلول های T-suppressor قسمت اعظم سلول های ایمنی را تشکیل داده و به تبع وجود آنها سیتوکینهای IL-4, IL-5, IL-10 در بدن افزایش می یابد. اما در فرم TT نسبت سلولهای T-cell CD-4+ به T-cell CD-8+ 2:1 بوده و سلولهای Cytotoxic قسمت اعظم سلول های ایمنی را تشکیل می دهند.

در این فرم سیتوکینهای INF- γ و IL-12 و IL-2 در بدن افزایش می یابد. در فرم TT نمونه لام Slit Skin رنگ آمیزی شده به روش اسید فست همیشه منفی بوده ولی تست پوستی لپرومین مثبت می باشد. اختلاف نتایج تستهای مذکور مربوط به نوع پاسخ ایمنی بدن نسبت به باکتری می باشد نه به جنس یا گونه باکتری. تست پوستی لپرومین ارزش تشخیصی ندارد چون در مناطق اندمیک اکثر افراد نسبت به این تست جواب مثبت می دهند. در واقع یک تست برای بررسیهای اپیدمیولوژیک می باشد [۳]. در فرمهای بینا یا Borderline علام بالینی و تستهای Slit Skin و تست پوستی لپرومین نتایجی ما بین دو فرم اصلی TT و LL دارند [۲].

با توجه به اینکه علام بالینی ایجاد شده بوسیله این باکتری بسیار ناخوشایند و غیرقابل برگشت بوده از جمله فلج دست و پا و چنگی شدن دستها و افتادگی پلکها بخاطر گرفتاری اعصاب و خوردگی غضروفها و استخوانها، مبتلایان به این بیماری از خانواده و اجتماع طرد شده و دیگر هیچ پناهگاهی ندارند چون هیچ آسایشگاهی آنها را نمی پذیرد حتی آسایشگاه بابا باغی هم که قبلاً این بیماران در آنجا اسکان داده می شدند دیگر پذیرای سکونت بیماران نبوده و فقط محل تشخیص و درمان بیماران می باشد.

هر ساله حدود ۷۰۰۰۰۰ مورد جدید در دنیا گزارش می شود [۳-۱]. با توجه به موارد ذکر شده بکار بردن روشی که دقیق و مطمئن بوده و بتواند قبل

می باشد. این باکتری با داشتن زمان تقسیم ۱۲ روز بالا ترین زمان تقسیم را در بین باکتریها دارد [۲،۱].

تا سال ۱۸۷۳ عامل بیماری ناشناخته بود و باور بر این بود که مبتلایان نفرین شدگان خداوند هستند و این باور به این خاطر بوده است که مبتلایان ظاهری بسیار ناخوشایند و زشت داشتند [۲].

تا اینکه در همین سال (۱۸۷۳) دکتر Gerhard Armauer Hansen که اهل کشور نروژ کنونی بود عامل بیماری را کشف کرد [۲].

بیماری جذام به دو فرم اصلی LL (Lepromatous Leprosy) و TT (Tuberculoid Tuberculoid) تقسیم بندی شده است که بعد از طبقه بندی Ridely & Jopling در سال ۱۹۶۶ به شش فرم زیر طبقه بندی شد:

LL (Lepromatous Leprosy)
BL (Borderline Leprosy)
TT (Tuberculoid Tuberculoid)
BT (Borderline Tuberculoid)
BB (Borderline Borderlin)
HI (Indeterminant)

تشخیص بیماری براساس علایم بالینی و بررسی لام میکروسکوپی رنگ آمیزی شده با روش اسید فست و تست پوستی لپرومین انجام می گیرد. دور کمون بیماری ۲۴-۶ ماه بوده و تا ۴۰ سال هم گزارش شده است. در فرم LL نمونه Slit Skin رنگ آمیزی شده با روش اسید فست مثبت بوده و باسیلها در لام محیطی به رنگ قرمز در زمینه آبی دیده میشوند اما تست پوستی لپرومین منفی دارد. در این فرم علایم پوستی از جمله پر رنگ تر و یا کمرنگ تر شدن محل ضایعه معمولاً قرینه بوده و در دو طرف بدن دیده می شود. بی حسی موضعی در محل ضایعه و حتی در سایر نقاط بدن نیز دیده می شود.

التهاب بیضه و افتادگی پلکها و دستها و پاها و اختلال در صحبت کردن بخاطر گرفتاری اعصاب منطقه، دیده می شود. بروز ندولهای قرمز رنگ که با شروع درمان وضع آنها وخیمتر می شود (ENL یا Erythema Nodosum Leprosom) از مشخصات بارز این فرم می باشد. ولی در فرم توبرکولوئید علائم با لینی خفیف

۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. PBS از مواد زیر تشکیل شده است: سدیم دی هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، کلرید سدیم و کلرید پتاسیم.

نمونه های بیوپسی ابتدا در یخچال ۱۰-۴ درجه سانتیگراد و سپس در دمای اطاق ذوب شدند. PBS موجود در میکروتیوبهای حاوی شده سبس به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر Protease Buffer که حاوی Guanidium Thiocyanate ، EDTA و Triton X-100 می باشد، روی نمونه بیوسپی ریخته شده و نمونه ها با سرسملپر استریل له شدند.

سبس به مقدار ۵ میکرولیتر پروتئاز به لوله اضافه شده و در ۵۵ درجه سانتیگراد بمدت ۳-۱ ساعت انکوبه شدند. مراحل فوق برای هضم بافتی بوده تا باکتری داخل سلولها آزاد گردد.

برای جداسازی ژنوم باکتریانمونه ها در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا آنزیم پروتئاز غیرفعال گردد. سپس بر روی لوله ها (میکروتیوب ها) محلول لیزکننده بمقدار ۴۰۰ میکرولیتر ریخته شده و بمدت ۲۰-۱۵ ثانیه بهم زده شدند.

سبس به هر کدام از لوله ها محلول رسوب دهنده اضافه کرده بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرارداده شدند و بعد از این مدت سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی دور ریخته شده و به هر یک از لوله ها بافر شستشو اضافه کرده بهم زده شده و سانتریفوژ شدند. سپس تمامی بافر شستشو دور ریخته شده و خشک گردیده و در مرحله آخر Solvent buffer اضافه شد. لوله ها با این محلول چندین بار شستشو داده شدند. محلول فوق حاوی DNA باکتری بود.

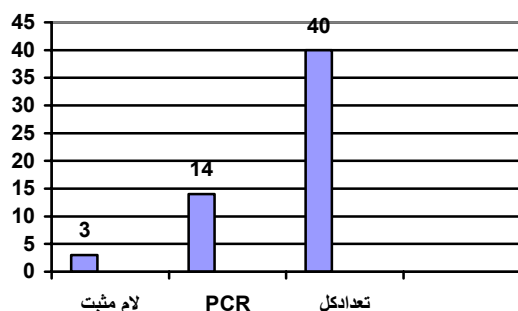
سبس DNA باکتری از نمونه های بافتی برداشته شده بوسیله روش Donoghue و همکارانش استخراج گشته و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی LP1 و LP2 که سکانس ۱۲۹ bp را آمپلی فای می کنند تکثیر یافته که عمل آمپلی فاینگ به تعداد ۴۵-۳۵ سیکل بمدت ۳۰

از بروز علائم بالینی بیماری را تشخیص دهد کاملاً ضروری به نظر می رسد چون در حال حاضر تشخیص فقط بوسیله لام مستقیم و علائم بالینی صورت می گیرد. تست پوستی لپرومین هم بخاطر عدم تولید آن انجام نمی شود.

امروزه روشهای مولکولی برای تشخیص دقیق بیماریهای عفونی بخصوص آنهایی که دوره کمون طولانی دارند بکار برده می شوند از جمله PCR که در این تحقیق از این روش استفاده شده است. این تحقیق برای تشخیص دقیق تر و مطمئن تر و همچنین مقایسه دو روش Slit skin smear و PCR انجام گرفته است. بیماران در صورت تشخیص اولیه توسط پزشک به تنها مرکز تشخیص و درمان بیماری یعنی بیمارستان بابا باغی معرفی شده و در صورت تشخیص بر اساس علائم بالینی و لام مستقیم تحت درمان قرار می گیرند که برخی از بیماران به لحاظ فرهنگی و اجتماعی و بعد مسافت و هزینه بر بودن مراجعه به بیمارستان بابا باغی از رفتن به این مرکز خودداری می نمایند در صورتیکه اگر تست PCR در برخی از شهرهای کشور انجام شود هم تشخیص دقیق و به موقع انجام شده و هم در هزینه ها صرفه جویی شده و مهمتر از همه اینکه از بار سنگین روانی بیماران کاسته می شود. در برخی از کشورها نیز روش PCR برای تشخیص بیماری جذام انجام گرفته و نتایج مشابه و قابل اعتمادی بدست آمده است.

روش کار

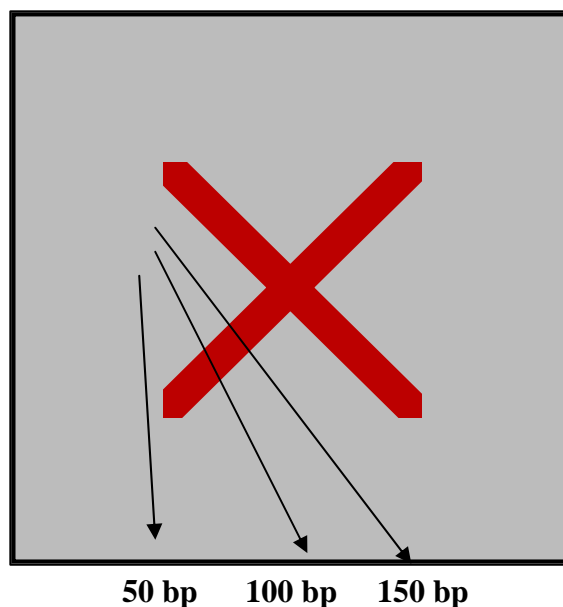
از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بابا باغی که تنها مرکز تشخیص و درمان بیماری جذام در ایران است با تیغ جراحی از نرمه گوشها و ابروها نمونه برداری شده (Slit Skin) و پس از تهیه گسترش بر روی لام رنگ آمیزی اسید فست شده و بررسی میکروسکوپی شدند. همزمان با بررسی میکروسکوپی نمونه بیوپسی با ۴ mm Punch ۵-۲ از بیماران برداشته شده در داخل میکروتیوبهای حاوی PBS (Phosphate buffer solution) فریز و در دمای



نمودار ۱. مقایسه روش لام مستقیم و PCR

یافته ها

از ۴۰ نمونه Slit Skin برداشته شده از بیماران ۳ نمونه (۷/۵٪) با روش لام مستقیم رنگ آمیزی شده با اسید فسفات مثبت بودند که هر ۳ بیمار مبتلا به فرم LL یا Lepromatous Leprosy بودند که دونفر مرد و یک نفر زن بودند. در صورتیکه از ۴۰ نمونه بیوپسی برداشته شده تعداد ۱۴ نمونه از بیماران با روش PCR نتیجه مثبت داشتند (۳۵٪) که با توجه به رقم قبلی اختلاف معنی داری بین دو روش وجود داشت.



شکل ۱. ژل آگاروز محصول PCR نمونه ها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

بحث

در سال ۱۹۹۳ مادلین ویت^۱ و همکارانش در لندن تعداد ۸۱ نمونه سواب بینی را که در کشور فیلیپین گرفته شده بودند را مورد آزمایش PCR برای تشخیص *M. leprae* قرار دادند. این تعداد نمونه مربوط به بیمارانی بود که ۲۰ نفر از آنها تحت درمان نبوده ولی ۵ نفر در حال درمان بوده اند که تشخیص همگی آنها نوع Multibacillar یا MB بوده است. ۵۶ نمونه مربوط به کارکنان بیمارستان بوده که این کارکنان به دو گروه تقسیم شده بودند :

- ۱- گروهی که با بیماران جذامی در تماس بوده اند.
 - ۲- گروهی که با بیماران در تماس مستقیم نبوده اند.
- نتایج تحقیقات آنها نشان داد که ۵۵٪ از بیمارانی که مبتلا به فرم MB بوده و تحت درمان قرار گرفته بودند ولی با وجود درمان نتیجه PCR مثبت داشتند. ۱۹٪ از ۳۱ نفر افرادی که با بیماران کاری کردند، نتیجه PCR مثبت داشتند. ۱۲٪ از ۲۵ نفر افرادی که در مناطق اندمیک بیماری زندگی می کرده اند ولی بظاهر سالم بوده اند نتیجه PCR مثبت داشتند. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده افرادی که در مناطق اندمیک زندگی می کنند و با بیماران جذامی هم، تماس ندارند می توانند ناقل بیماری باشند [۴].

یوون^۲ و همکارانش در کره و فیلیپین ۱۰۲ نمونه بیوپسی را قبل از شروع درمان از بیماران جذامی

¹ Madeleine wit

² Yoon

هیستوپاتولوژیک و دیگری برای آزمایش PCR بکار برده شدند. تنها در دو مورد از نمونه هایی که بررسی هیستوپاتولوژیک شده بودند باسیل M.Lepra مشاهده شده بود در حالیکه ۱۱ مورد نتیجه ی PCR مثبت داشتند [۸].

آقای اسکولارد^۶ و همکاران برای تشخیص افتراقی بیماری جذام از سایر بیماریهای میکوباکتریال بخصوص بیماریهای پوستی از روش PCR استفاده کردند. آنها از ۳۷ بیمار نمونه ی بیوسپی برداشتند. ۲۰ مورد از این نمونه ها تشخیص هیستوپاتولوژیک جذام داده شده بودند. که فقط ۱۰ مورد از آنها نتیجه ی PCR مثبت داشتند. ۱۷ مورد هم تشخیص جذام براساس لام مستقیم و نتایج هیستوپاتولوژیک داده شده بودند که PCR منفی داشتند.

یک سوم از نمونه هایی که لام مستقیم منفی و نتایج هیستوپاتولوژیک مبنی بر عدم وجود بیماری جذام را داشتند، نتیجه ی PCR آنها مثبت بوده است. با توجه به تغییر الگوی بیماری در مناطق مختلف و همچنین اسید فست بودن سایر میکوباکتریومها و علائم بالینی مشابه با سایر بیماریها بکار گیری روش PCR در تشخیص افتراقی، روش معقول و قابل اعتمادی بنظر می رسد [۹].

در سال ۱۹۹۲ ویلیامز^۷ و همکاران تعداد ۹۲ نمونه بیوسپی از بیماران جذامی مبتلا به فرم MB را تحت آزمایش PCR قرار دادند از این تعداد ۹۹٪ دارای نتیجه PCR مثبت بودند. آنها ۲۷ نمونه بیوسپی از بیماران مبتلا به فرم PB را که فقط یکی از آنها دارای لام مستقیم مثبت داشتند با روش PCR مورد آزمایش قرار دادند که ۷۴٪ از کل ۲۷ نمونه بیوسپی دارای نتیجه PCR مثبت بودند. هیچ یک از نمونه های کنترل و یک نمونه از بیماری که HIV مثبت و دارای Mycobacteriosis بوده نتیجه PCR مثبت نداشتند. بیماران تحت معاینه قرار گرفته و بعد از دو ماه درمان دوباره با تست PCR مورد آزمایش قرار گرفتند و

گرفتند. همزمان با این نمونه برداری نمونه Slit skin نیز از بیماران گرفته شده، سپس نتایج PCR نمونه های بیوسپی با نتایج لام رنگ امیزی شده با روش اسید فست مقایسه شد. ۷۳/۳٪ از نمونه هایی که شاخص باکتریولوژیک (BI)^۱ آنها صفر بوده دارای نتیجه PCR مثبت بوده اند. ۹۶/۶٪ از نمونه هایی که شاخص باکتریولوژیک مثبت داشتند، نتیجه PCR آنها نیز مثبت بوده است [۵].

آقای وچکارن^۲ و همکاران از ۵۳ بیمار در تایلند نمونه برداری Slit skin و بیوسپی کردند. از این ۵۳ بیمار ۳۱ مورد Multi bacillar یا MB و ۲۲ بیمار Pauci bacillar یا PB بوده اند که ۸۷/۱٪ از ۳۱ بیمار Multi bacillar و ۴۱/۹٪ از نمونه های Slit skin دارای نتیجه PCR مثبت بوده اند. در حالیکه در افراد PB ۳۶/۴٪ از نمونه های بیوسپی و ۱۸/۲٪ از نمونه های Slit skin نتیجه PCR مثبت داشته اند [۶].

در سال ۲۰۰۰ شای^۳ و همکاران در ایالت سیچوان^۴ چین ۴۶ نمونه بیوسپی از بیماران با تشخیص اولیه ی جذام را مورد آزمایش پاتولوژیک، سرو لوژیک و PCR قرار دادند. از این ۴۶ نمونه ۲۷ مورد (۵۸/۷٪) نتیجه PCR مثبت داشتند. در حالیکه فقط ۷ مورد (۱۵/۲٪) نتیجه ی پاتولوژیک مثبت و ۱۷ مورد (۳۶/۹٪) آزمایش سرولوژیک مثبت نشان دادند. بدین ترتیب تحقیق آنها مشخص ساخت که روش PCR برای تشخیص بیماری جذام، نسبت به روش های پاتولوژیک و سرولوژیک دقیق تر و قابل اعتمادتر می باشد [۷].

در کشور همسایه ی چین که یک منطقه اندمیک برای بیماری جذام است، یعنی هندوستان که رتبه ی اول را در این بیماری دارا می باشد، جاب^۵ و همکارانش در سال ۱۹۹۷ از ۳۶ نفر بیمار که مشکوک به بیماری جذام بوده اند نمونه ی بیوسپی گرفتند. نمونه های بیوسپی دوتکه شدند. یکی برای آزمایش

¹ Bacteriologic Index

² Wechkam

³ Shi

⁴ Sichuan

⁵ Job

⁶ Scollard

⁷ Williams

قراردادند که از این ۱۵ نمونه ۵ مورد مثبت بوده اند که ۲ مورد از این ۵ مورد لام منفی داشته اند. البته نتیجه لام مستقیم مربوط به شش ماه قبل از بیوپسی بوده است [۱۲].

در تحقیق اخیر مشخص شد که تفاوت دو روش لام مستقیم و PCR بسیار چشمگیر بوده و با تحقیقات انجام شده در سایر کشورها همخوانی دارد.

نتیجه گیری

روش Slit skin smear برای تشخیص بیماری جذام روش مناسب و دقیقی بخصوص برای فرم TT نمی باشد. آزمایش PCR بهترین راه تشخیص بیماری جذام و غربال کردن ناقلین می باشد.

تشکر و قدر دانی

از همکاری صمیمانه خواهران روحانی مسیحی: خواهر فابیولا، خواهر جوزینا، خواهر سلما، خواهر راشل و برادر روحانی مسیحی برادر اسلیوا و خانم سبیللا زارعی و سایر کارکنان بیمارستان بابا باغی نهایت تشکر و قدر دانی را از صمیم قلب دارم.

معلوم شد که موارد مثبت بجز در مواردی که نسبت به درمان مقاومت نشان داده بودند کاهش یافته است. در واقع آنها PCR را برای پیگیری درمان نیز بکار بردند و نتیجه گرفتند که روش PCR برای موثر بودن درمان بسیار مناسب می باشد [۱۰].

در سال ۲۰۰۱ داناگو و همکاران تعداد ۸ پرایمر (LP1-LP8) را برای تشخیص مایکوباکتریوم لپر بکار بردند که پرایمرهای LP2, LP1 اسکانس 129-bp را آمپلی فای می کنند. با توجه به اینکه تعداد bp هایی که هدف پرایمرهای P مذکور هستند از نظر تعداد کمتر از bp هایی هستند که هدف پرایمرهایی از جمله S13, S62, می باشند. لذا حساسیت پرایمرهایی LP2, LP1 را 100 برابر بیشتر از پرایمرهای S62, S13 می باشد. حتی می توانند DNA هایی را که آسیب دیده و تکه تکه شده اند را نیز تشخیص دهند. لذا با عنایت به موارد ذکر شده پرایمرهای LP2, LP1 برای تشخیص M. leprae در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان باباباغی بکار برده شدند [۱۱].

وحید صادقی و همکاران در گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران از ۱۵ بیمار درمان شده نمونه بیوپسی برداشته و با روش PCR و بکارگیری پرایمرهای S62, S13 مورد آزمایش

References

- 1- Brooks GF, Butel JS. Mycobacteria. In: Javetz, Melnik, Adelberg. Medical Microbiology, 20th ed. USA: McGraw Hill, 2001: 283-84.
- 2- Wolinsky E. Mycobacteria. In: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg SH. Microbiology, 4th ed. USA: Lippincott, 1990: 661-63.
- 3- Gelber RH, Rea TH. Mycobacterium leprae. In: Mandel, Douglas, Bennet: Principal and Practice of infection, 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2000: 2608-14.
- 4- Madelein YL, De wit MYL, James TD, Mcfadden J, Klaster PR. Polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae in nasal swab specimens. J. Gen. Microbiol. 1993 Mar; 31: 502-6.
- 5-Yoo KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona RV, Fajardo TT, et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of Mycobacterium leprae-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. J. Clin. Microbiol. 1993 Apr; 31: 895-9.
- 6- Wichiwachkarn J, Karnajan S, Shuntawuttiesettec S, Sornprasit C, Kampirapakorn K. Detection of Mycobacterium leprae infection by PCR. J. Clin. Microbiol. 1995 Jan; 33: 45-9.
- 7- Shi L, Yajima M, Kawatsu K, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Endoh M. Comparison of Polymerase chain reaction, immunohisto-chemistry and Conventional histopathology in the diagnosis of early leprosy in Sichuan province of China. Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi. 2000 Nov; 69: 147-55.

- 8- Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact. Dis.* 1997 Dec; 65: 461-4.
- 9- Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase Chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United states. *Am. J. Clin Pathol.* 1998; 109: 642-6.
- 10- Williams DL, Gills TP, Fillo P, Job CK, Gelber RH, Hill C, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring anti leprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR, *Mol Cell Probes.* 1992; 6: 401-10.
- 11- Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50: 177-82.
- ۱۲- صادقی وحید، مقصودی نادر، دولتی یحیی، دلدار علی اصغر، حیدری سراج مهران، استفاده از انتی ژنهای ۳۶۱۸ کیلو دالتونی مایکوباکتریوم لپره برای تشخیص نمونه بیماران ایرانی مبتلا به جذام با روش مولکولی PCR: فصلنامه بیماریهای پوستی، سال ۱۳۸۴، دوره ۸، شماره ۵، صفحات ۳۸۸ تا ۳۹۳.