

MIKROBIOLOŠKA IDENTIFIKACIJA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Prim.dr. Minelfa Iović

U posljednjih 10 godina tuberkuloza postaje ponovno globalni problem u svijetu zbog HIV/AIDS epidemije, povećanog broja imigranata iz zemalja sa visokom incidencom tuberkuloze, povećanja siromaštva, uzimanja droge, beskućništva, neprihvatljivosti terapijskih režima, povećanog broja ljudi u ustanovama za zbrinjavanje.

U okviru nacionalnog programa za kontrolu tuberkuloze osnovna uloga bakteriološke laboratorije sastoji se u detekciji infektivnih oblika plućne tuberkuloze, praćenju uspjeha terapije i potvrdi izlječenja po završetku terapije. Pored toga, bakteriološka laboratorija učestvuje u dijagnostici plućnih i vanplućnih oblika tuberkuloze. Korišćenje standardizovanih mikrobioloških tehnika i dobra organizacija laboratorijske mreže obezbjeđuju kvalitetnu dijagnostiku, tako da se dobijeni rezultati mogu upoređivati između različitih laboratorija.



Slika 1. Rad na dijagnostici *M. tuberculosis* zahtijeva Biosafety Level 3.

Rod *Mycobacterium* spada u porodicu *Mycobacteriaceae*, u kome se nalazi preko 30 raznih vrsta. Na osnovu pojedinih osobina, naročito parazitizma i patogenosti Međunarodna radna grupa za taksonomiju mikobakterija podjelila je vrste roda *Mycobacterium* u tri grupe:

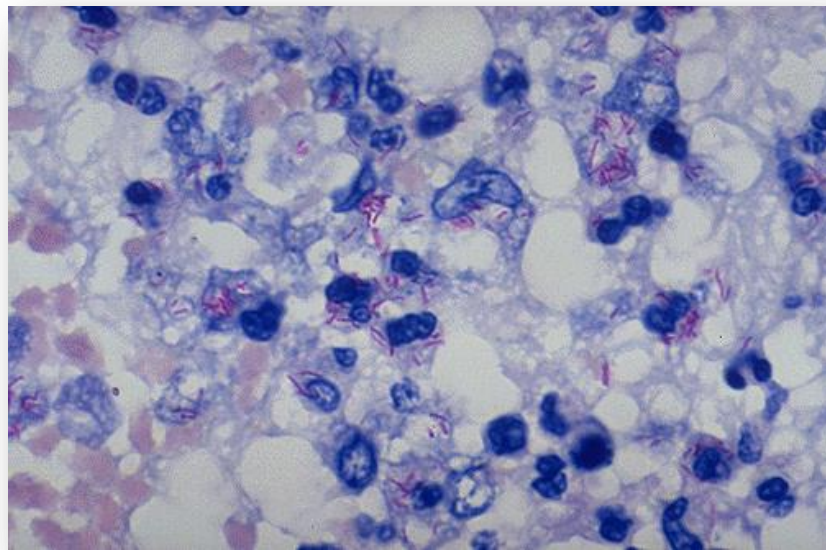
- patogene mikobakterije
- uslovno patogene mikobakterije
- nepatogene mikobakterije.

Danas se najčešće upotrebljava podjela na:

- mikobakterije koje izazivaju tuberkulozu
- atipične ili anonimne mikobakterije
- mikobakterijum lepre
- nepatogene bakterije.

U mikobakterije koje izazivaju tuberkulozu spadaju slijedeće vrste:

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium africanum*.



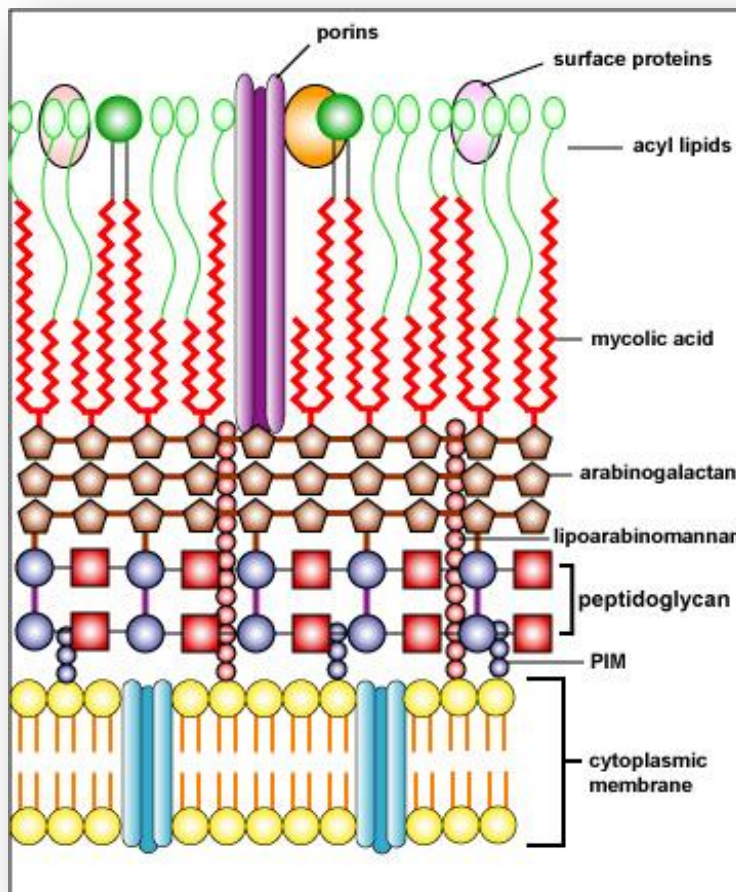
Slika 2. *Mycobacterium tuberculosis*

1882. godine njemački bakteriolog Robert Koch je otkrio uzročnika tuberkuloze. Pojedine vrste ove bakterije su pravi ili lagano savijeni vitki štapići dugački 1 do 4 i široki 0,3 do 0,6 um. Raspoređeni su pojedinačno ili grupisani u vidu slova X, V ili M, ponekad su nanizani i u lance. Virulentni sojevi pokazuju oblike u vidu užadi ili združenih vlakana tkv. „cord-oblike“. *M. tuberculosis* može imati i kokoidni oblik, a izuzetno može biti u obliku štapića sa razgranatim krajevima u obliku vlakana. Osim citoplazmatske membrane i ćelijskog zida sadrži spoljašnji amorfnu sloj. Zbog svog hemijskog sastava ćelijski zid se može bojiti samo specijalnom tehnikom bojenja, najčešće po Ziehl-Neelsen-u.

Funkcionalni i za aktivnost važni hemijski sastavni dijelovi se nalaze u njenom ćelijskom zidu. Lipidi su najvažnije komponente *Mycobacterium tuberculosis*. Čine 40 % suhe supstance bakterije. Oni daju acidoalkoholnu rezistenciju ovoj bakteriji, zatim uslovljavaju njene

karakteristike razmnožavanja i rasta i obezbeđuju joj patogenost. Ti se lipidi nazivaju tuberkulolipidi, a među njima je najvažnija klasa mikoziidi.

Mikolična kiselina je jedna od mikoziida. Ova β -hidroxi masna kiselina postoji slobodna ili vezana sa ugljenikovim hidratima kao glikolipid. Mikolična kiselina je acidoalkoholno rezistentna. Fosfolipidi čine značajan dio lipida ove bakterije i njihova je uloga u stimulaciji produkcije antitijela zbog toga što raspolažu antigenskim osobinama.



Slika 3. Ćelijski zid *M. tuberculosis* sa lipidima

Ćelijski zid *M. tuberculosis* je bogat kompleksnim lipidima:

- peptidoglikan
- razgranate polisaharidne polimere (ARABINOGALAKTAN I LIPOARABINOMAN)
- mikolična kiselina (dimycolytrehalosa ili cord faktor)
- sulfolipidi (sprečavaju fagosom lizozim fuziju nakon fagocitoze)

Po svojoj topivosti u raznim rastvaračima postoje 4 voska: A,B, C i D. Vosak C sadrži phitoceryl-dimycolerol, gliceride i cord.faktor. Cord-faktor po svome sastavu je trehaloza-

6,6,6-dimicolat koji uzrokuje rast ćelija u vidu isprepletanih užadi. Djeluje kao lijepak koji omogućava da se poprečno podijeljene ćelije bacila tuberkuloze odvoje od ćelija koje se nalaze ispod podijeljenih štapića.

Klasična bakteriološka dijagnostika je dugotrajan proces (najčešće duži od dva mjeseca) i podrazumijeva ponavljano uzimanje bolesničkog materijala. **Za rutinsku dijagnostiku dovoljno je ispitati mikroskopske, kulturelne i biohemijske osobine bacila tuberkuloze. Pozitivne kulture zahtijevaju test osjetljivosti na antituberkulotike.**

DIJAGNOSTIKA M. TUBERSULOSIS

M. tuberculosis se otkriva metodom mikroskopije, kultivisanja i biološkog ogleda.

Bakteriološko ispitivanje bolesničkog materijala (mikroskopski razmaz i/ili kultivacija) vrši se kod sumnje na tuberkulozu ili u cilju praćenja uspjeha liječenja. Uzimaju se po tri uzorka bolesničkog materijala za dijagnostikovanje oboljenja, a dva uzorka radi praćenja uspjeha liječenja svakog mjeseca i na kraju terapije.

U velikim mikobakteriološkim laboratorijama, pored klasične mikrobiološke dijagnostike, danas se sve više koriste nove brze metode koje se zasnivaju na bržoj detekciji rasta mikobakterija i molekularnim tehnikama.

Tuberkuloza može zahvatiti bilo koji organ ljudskog tijela. Stoga se na bakteriološku pretragu na tuberkulozu mogu poslati različiti klinički uzorci. Bez obzira na vrstu uzorka koji se pregleda, temelj uspješne laboratorijske dijagnostike tuberkuloze je kvaliteta uzorka.

Vrste uzoraka

Na analizu se dostavljaju **tri uzorka sputuma** u količini 2 ml do 5 ml, **bronhijalni aspirat** (2 ml - 5 ml), **bronhoalveolarni lavat** (20 ml – 40 ml), **transbronhijalni bioptat** (dodati 0,5 ml – 1 ml sterilne fiziološke otopine da se spriječi isušivanje), **pleuralni punkt** (20 ml – 50 ml), **pleuralni bioptat**, **gastrični aspirat** (ranojutarnji, dok je stomak prazan, odmah transportovat u laboratoriju, gdje se vrši neutralizacija sa 1 ml – 2 ml 10 % trisodium fosphatnim rastvorom ili sa 100 mg Na bikarbonata, ovisno o volumenu uzorka), **spinalna**, **pleuralna**, **perikardijalna**, **sinovijalna tečnost**, **krv** (5 ml – 10 ml citrirane krvi), **gnoj**, **koštana srž** itd.

Dijagnostika

I Mikroskopija: Najjednostavniji i brz način traženja uzročnika tuberkuloze u patološkom materijalu je mikroskopija direktnog razmaza, najčešće ispljuvka. Gnojavi dijelovi ispljuvka se razmažu na staklenoj pločici i boje specijalnom tehnikom po metodi Ziehl-Neelsen-a. Da bi se u direktnom preparatu našli ovi bacili mora ih biti najmanje 100 000 u 1 ml uzorka.

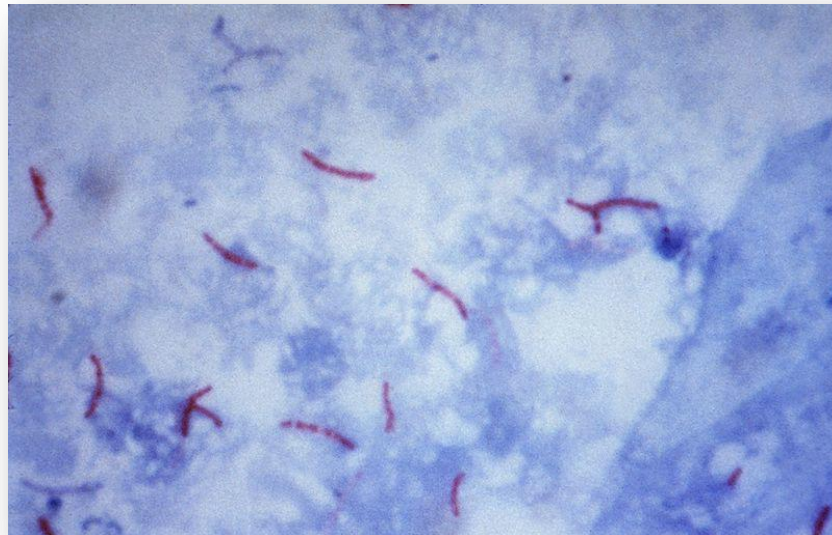
Patološki materijal mora se homogenizovati sa 4 % -tnim rastvorom NaOH , zatim inkubirati na 37°C do potpune homogenizacije i dekontaminacije. Nakon termostatiranja uzorke centrifugirati 20-30 minuta na 2500-5000 obrtaja u minuti (faza koncentracije).

Odlije se supernatant, a od sedimenta se pravi preparat, osuši na sobnoj temperaturi i boji po Ziehl-Neelsenu.

Diferencijalno bojenje po Ziehl – Neelsenu:

- Pripremljene preparate fiksirati na plamenu.
- Brojeve na preparatima popisati na papir i tim redosljedom poredati uzorke u slučaju da se brojevi u toku bojenja izbrišu.
- Preparat bogato zaliti bojom karbol fuksina (originalna boja Ziehl Neelsen).
- Zagrijavati tri puta do pojave isparavanja i ostaviti pet minuta.
- Saprati destilovanom vodom.
- Preparat odbojavati kiselim alkoholom sve dok se ne dobije čist preparat.
- Isprati destilovanom vodom.
- Preliti preparat bojom metilensko plavo i sačekati 2-3 minute.
- Saprati destilovanom vodom i osušiti na stalku.

Iz ovako obojenog homogenizovanog i koncentrovanog materijala vrši se mikroskopija razmaza sedimenta uz korištenje cedrovog ulja.



Slika 4. M. tuberculosis bojenje po Ziehl – Neelsenu

II Kultivisanje: Sediment dobijen nakon homogenizacije i centrifugiranja se neutrališe sa kiselinom 2 % H₂SO₄, kojoj je dodato neutralno crveno kao indikator (kis.-crveno, alkal.-žuto, ph 6,8 - 8). Može se koristiti HCl-a (indikator metil. narandž., kis.-crv., alkal.- žutonar., ph 3,1 – 4,4) kap po kap do pojave ljubičaste boje, zatim pažljivo kap po kap do pojave limun žute boje (boja se može korigovati lužinom).

U pogledu nutritivnih zahtjeva M. tuberculosis je izbirljiva bakterija koja ima određene karakteristike. Zbog toga se ne razmnožava na običnim već na specijalnim hranjivim podlogama, u aerobnim uslovima, pri temperaturi od 37°C, u ph sredini 6,7 - 6,9, šest nedelja, tj. 42 dana. Svakih sedam dana zasijane epruvete treba zalijevati, tj. naginjati u kosi položaj.

Za uzgajanje ove bakterije korištene su tečne podloge: Youmansova, Duboosova, Šula, Tarchiisova podloga, ali su se bolje pokazale čvrste podloge kao: Petroffljeva, Petrognanijeva, Middelbookova, Lowenstein- Jensenova i UIT-ova podloga.

Najpogodnija za rutinski rad su Lowensteinova i UITova podloga koja je ustvari modifikacija Lowensteinove podloge.

Lowenstein- Jensenova podloga se sastoji od:

- Malachite green
- Glycerol
- Asparagine
- Potato starch
- Coagulated eggs
- Mineral salt solution
 - ✓ Potassium dihydrogen phosphate
 - ✓ Magnesium sulfate
 - ✓ Sodium citrate

Uzgajanje uzročnika tuberkuloze iz ljudskog materijala na ovim podlogama je sporo, jer je za vidljiv porast kolonija potrebno najmanje oko 10-12 dana inkubacije, a da postignu puni rast poslije 3 do 8 sedmica. Lowensteinova podloga predstavlja „zlatni standard“ za kultivaciju ove bakterije.



Slika 5. Lowensteinova podloga sa kolonijama *M. tuberculosis*

Morfologija kolonija je karakteristična: grube, debele sa naboranom površinom, nejednake veličine, mogu biti pigmentirane od bijele do nejasno mrkožute ili žute boje, te se teško emulguju u fiziološkom rastvoru. Ovako spor rast bacila tuberkuloze na podlogama objašnjava se promjenama u metabolizmu bakterija pod utjecajem antituberkulotika, te se vrijeme

inkubacije produžilo na 3 mjeseca. Ako ne izrastu kolonije na podlozi poslije ovog vremena, rezultat se smatra negativnim.

Ukoliko imamo porast kolonija, koje svojom morfologijom podsjećaju na bacile tuberkuloze, potrebno je napraviti razmaz i obojiti kolonije po Ziehl- Neelsenu i mikroskopirati pod uvećanjem od 1000x. Na preparatu ćemo vidjeti karakteristično raspoređene bacile u vidu isprepletanih užadi, tkz. „ Cord-faktor“. Sa sigurnošću se možemo tvrditi da se radi o acidoalkoholo-rezistentnim bakterijama.



Slika 6. Cord-faktor

Zbog bolje dijagnostike potrebno je skratiti vrijeme čekanja na nalaz. Zato se danas pored klasične obrade materijala i zasijavanje materijala na čvrstu Lowenstein-Jensenovu podlogu koriste i tečne podloge. Otkrivanje mikobakterija u tekućim podlogama korištenim zajedno s čvrstim medijima rezultat je potrebe za skraćivanjem vremena kultivacije, te ostalih postupaka u laboratorijima.

Zbog brže identifikacije i kultivacije bacila Mycobacterium tuberculosis krajem 2008. godine, pored klasične dijagnostike ovog bacila na Lowenstein- Jensenovim podlogama, u našoj laboratoriji uveli smo i identifikaciju i kultivaciju ovog bacila pomoću tečne MGIT podloge i očitavanje rezultata koristeći UV lampe i BACTEC MicroMGIT in vitro dijagnostički instrument.

Ovom metodom pomoću UV svijetla duge valne dužine 365 nm i BACTEC MicroMGIT instrumenta pratimo porast acidoalkoholno-rezistentnih bakterija u MGIT epruvetama sa tečnom podlogom.

BACTEC MicroMGIT je in vitro dijagnostički instrument dizajniran za korištenje BBL MGIT 4 ml epruveta za brzu detekciju mikobakterija iz kliničkog materijala (izuzev krvi i urina).

Ovaj sistem se zasniva na otkrivanju mikobakterija prema potrošnji kisika u epruveti. Na dnu epruvete se nalazi silikon s kisik-labilnim fluorescentnim indikatorom. Potrošnja kisika i rast mikobakterija se mjeri obasjavanjem ultravioletnom svjetlošću pri čemu se javlja fluorescencija. Rast se također može uočiti i prisustvom nehomogene замуčenosti ili malih zrnaca ili pahuljica u podlozi.

Sve vrste kliničkih uzoraka izuzev krvi i urina mogu se zasađivati i očitavati ovom metodom.

Sa ovim sistemom se brže otkrije rast bacila tuberkuloze, brže se diferencira *M. tuberculosis* od ostalih mikobakterija.



Slika 7. BACTEC MGIT aparat

MIGT epruveta sa indikatorom rasta sadrži 4 ml modificiranog Middlebrook 7H9 bujona. Kompletna podloga sa 0,5 ml OADC i 0,1 ml PANTA mješavine antibiotika, je jedna od najčešće korištenih tekućih podloga za kultivaciju mikobakterija.



Slika 8. MIGT tečna podloga

BBL MIGT OADK sadrži 15ml Middlebrook OADK obogaćenja: bovini albumin (djeluje kao zaštitni agens vezujući slobodne masne kiseline koje mogu biti toksične za vrstu Mycobacterium), oleinsku kiselinu (koja igra važnu ulogu u metabolizmu ovih bakterija), dekstrozu (koja je izvor energije) i katalazu (koja razgrađuje toksične perokside koji mogu biti prisutni u podlozi).

BBL MGIT PANTA sadrži liofiliziranu mješavinu antibiotika: Polymyxin B, Amphotericin, Nalidiksičnu kiselinu, Azlocillin, Trimetoprim.

Svaki uzorak se mora pripremiti metodom NALC-NaOH, obraditi tako da prođe fazu homogenizacije, dekontaminacije i koncentracije.

Sputum - Uzorci se pripremaju koristeći NALC-NaOH metodu kako je preporučeno od strane CDCs Public Health Mycobacteriology: A Guide for Level III Laboratory.

Želudačni sadržaj - Uzorak se dekontaminira isto kao sputum. Ako je količina uzorka preko 10 ml koncentrirajte materijal koristeći centrifugu. Resuspendiraj sediment sa oko 5 ml sterilne vode i onda dekontaminiraj. Dodaj malu količinu NALC-a u prahu (50-100 mg) ako je uzorak čvrst ili mukozan. Nakon dekontaminacije uzorak koncentriraj ponovo prije zasijavanja u MGIT epruvetu.

Tjelesne tečnosti (sinovijalna tečnost, pleuralni punktati...) – Uzorci koji se uzimaju aseptično i gdje se očekuje da neće biti drugih bakterija mogu se zasijati bez dekontaminacije. Ako je količina uzorka preko 10 ml, koncentriraj sa centrifugom 3000 obrtaja 15 min. Odstrani supernatant. Inokuliraj sediment u MGIT epruvete. Uzorci gdje se nalaze i druge bakterije moraju biti dekontaminirani.

Stolica - Dodaj 1 gr stolice u 5 ml Middlebrook bujona. Mješaj na vorteksu oko 5 sec. Nastavi sa NALC-NaOH procedurom kako preporučuje CDCs Public Health Mycobacteriology: A Guide for Level III Laboratory.

POSTUPAK OBRADJE MATERIJALA

1. U centrifugalne građirane epruvete dodati do 5 ml uzorka (sputum ili sediment)
2. Na uzorak za analizu dodati istu količinu mješavine za dekontaminaciju NALC-NaOH (npr. 5ml uzorka + 5 ml mješavine)
3. Zatvoriti epruvetu i mješati na mješalici (vorteks) 5-20 sec., uzorak se mora homogenizovati. Promješaj epruvetu tako da budeš siguran da je NALC mješavina dotakla sve površine epruvete i poklopca.
4. Stavi tako pripremljene uzorke na tresilicu 15-20 min. ili isti period bez miješanja. Vrijeme ne smije biti prekoračeno (ne duže od 20 min.)
5. U svaku epruvetu doliti do vrha sterilnog fosfatnog pufera pH 6.8 (na Podhrastovima dodaju sterilnu destilovanu - dejonizovanu vodu). Zatvoriti epruvetu i ručno promješati. Omjer mješavine uzorak + NALC u odnosu na pufer oko 1:3 i više (10ml : 30 ml)
6. Odmah centrifugirati 20 min. na 3300 obrtaja (faza koncentracije)
7. Odliti supernatant u posudu sa sredstvom za dezinfekciju

8. Sa sterilnom pipetom na sediment dodati malu količinu (1 ml) fosfatnog pufera pH = 6,8, tako da ukupni volumen uzorka bude od 1 do 3 ml.

POSTUPAK ZASIJAVANJA MATERIJALA

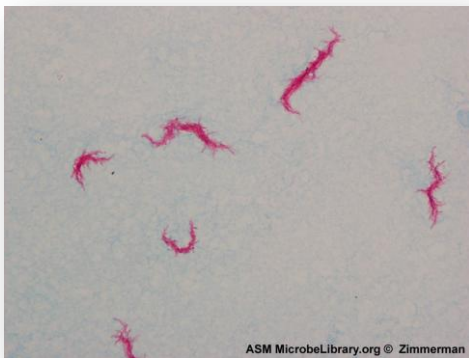
1. Označiti MGIT epruvetu brojem sa uzorka.
2. Odviti čep epruvete i aseptično dodati 0,5 ml MGIT OADC.
3. Aseptično dodati 0,1 ml otopljene PANTA mješavine antibiotika. Za bolje rezultate dodavanje OADC i PANTA treba napraviti neposredno prije nasijavanja.
4. Dodati 0,5 ml koncentrovanog uzorka. Također staviti kap (0,1 ml) uzorka na čvrstu podlogu za TBC. Količina veća od 0,5 ml može dovesti do povećanja opasnosti od kontaminacije.
5. Čvrsto zaviti čep od epruvete i dobro promućkati.
6. Epruvete inkubirati na 37° C.

Obradeni uzorak se inokulira u MGIT epruvetu, inkubira i očitava svakog dana pomoću UV svijetla i BACTEC MicroMGIT instrumenta, počevši od drugog dana inkubacije.

Kada se epruveta očita kao pozitivna, u njoj, u tom trenutku, ima otprilike 10 000 – 10 000 000CFU/ml mikobakterija.

Ukoliko se **golim okom vide zrnaste formacije u epruveti**, koristeći sterilnu pipetu skinemo jedan broj kolonija i **napravimo razmaz obojen po Ziehl-Neelsen-u**, tkz. „cord“. Ukoliko je **preparat negativan** epruvetu treba tretirati kao kontaminaciju.

Ukoliko je **nalaz pozitivan**, tj. ako se nađu acidorezistentni bacili koji formiraju mrežaste i lančaste formacije, uzorak se šalje na dalju obradu radi potvrde o kojoj se tačno mikobakteriji radi i testa osjetljivosti na antituberkulotike.



A



B

Slika 9. A. »Cord« preparat dobijen iz uzorka poraslog u MGIT podlozi. **B.** Subkultura na Lowenstein- Jensenovoj podlozi, porasla iz uzorka u MGIT-u.

III Biološki ogled - Uzročnici tuberkuloze iz ljudskog materijala mogu se uzgajati na životinjama i na kulturi tkiva.

Na zamorcu, na unutrašnjoj strani gornje trećine nadkoljenice, količinu od 1 ml obrađenog patološkog materijala inokuliše se subkutano. Ukoliko se u inokulisanom materijalu nalazio *Mycobacterium tuberculosis* na mjestu inokulacije će se razviti otok, a zatim apsces koji ostaje

do smrti životinje. Javlja se otok limfnih žlijezda, prije svega ingvinalne regije, zatim se infekcija širi na unutrašnje organe: slezenu i jetru (koje se znatno uvećaju). Rjeđe su zahvaćena pluća. Smrt životinje nastupa u roku od 2 do 6 mjeseci poslije inokulacije.

Zaraženom zamorcu poslije 3-4 nedjelje izvrši se tuberkulinski ogled radi provjere da li je došlo do tuberkulozne infekcije.

Šest nedjelja nakon infekcije životinja se ubije i radi se obdukcija. Makroskopski se pregledaju jetra i slezena, eventualno i pluća. Sa sumnjivih mjesta uzima se bris, boji i mikroskopiše po Ziehl- Neelsenu.

Inokulacija patološkog materijala zamorcu za dokazivanje *Mycobacterium tuberculosis* bio je veoma efikasan metod, ali širokom primjenom INH u terapiji, njegov značaj je smanjen budući da INH rezistentni bacili daju samo lokalne regresivne reakcije - lezije.

Izolovanje mikobakterija tuberkuloze i uzgajanje na kulturi tkiva je metod kojeg su uveli Shephar i Sehelleuberg 1958. godine. Utagawa je 1962. godine u Japanu veoma uspješno razvio ovu metodu.

Savremenu radiometrijsku metodu (BACTEC) za brzo određivanje prisustva mikobakterija u bolesničkom materijalu za sada koriste samo velike laboratorije. Ovom metodom se određuje količina obilježenog ugljenika iz podloge koji je metabolizmom mikobakterija prešao u ugljen dioksid. Široka primjena BACTEC-metode za sada je ograničena iz ekonomskih razloga. Međutim, zbog visoke senzitivnosti, specifičnosti i brzine dobijanja rezultata sigurno će u budućnosti naći svoje mjesto u rutinskoj dijagnostici tuberkuloze.

Najnovija metoda za brzu identifikaciju *M. tuberculosis* je PCR metoda, kojom se detektira *M. tuberculosis* kompleks DNA direktno iz različitih uzoraka, bez čekanja porasta kulture. Rezultat se dobije isti dan, a jedna od metoda se zasniva na detekciji genotipa katG gena, koji je prisutan kod svih rodova *Mycobacterium tuberculosis* complex-a.

Napredak u dijagnostici tuberkuloze predstavlja **test XpertMTB/RIF**. U upotrebi je u 26 zemalja. To je test koji je poboljšana verzija testa amplifikacije nukleinskih kiselina. Uz otkrivanje DNA mikobakterija, istovremeno otkriva i rezistenciju na rifampicin. Kod bakteriološki dokazanih tuberkuloza, osjetljivost testa je 98 %, specifičnost 99 %, a uz to otkriva i 98 % mikobakterija rezistentnih na rifampicin. Razloga za zadovoljstvo daje i činjenica da je rezultat testa dostupan već za 100 min.

Trenutno su u razvoju i različiti drugi testovi poput **Line probe assay for XDR-TB, Manual nucleic acid amplification test 1st generation, Rapid colorimetric drug susceptibility test koji su u naprednoj fazi razvoja, te point-of-care test** (za otkrivanje tuberkuloze na licu mjesta), **Prediction** (za detekciju latentne tuberkulozne infekcije) i **Manual nucleic acid amplification test 2nd generation**, koji su u ranoj fazi razvoja.

Literatura:

1. Karakašević B. i saradnici: Mikrobiologija i parazitologija. 5. Izd. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga; 1987.
2. Smrekar Sironić S. Dijagnostika Mikobakterija. [online]. Dostupno na URL: <http://www.bolnica-klenovnik.hr/index.php?task=group&gid=9&aid=659>

3. Harvell JD, Hadley WK, Ng VL. Increased sensitivity of the Bactec 460 mycobacterial radiometric broth culture system does not decrease the number of respiratory specimens required for a definitive diagnosis of pulmonary tuberculosis, *J Clin Microbiol* 2000; 38 (10): 3608-11.
4. Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ: Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 393-7.
5. Kukavica D. Dijagnostika tuberkuloze - naše mogućnosti i stremljenja. [online]. *Pneumon* 2004;41. Dostupno na URL: http://www.respiron.rs/pneumon41/originalni_radovi/dijagnostika_kukavica41_53.php