



RAPID AND SPESIFIC DETECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS USING POLYMERASE CHAIN REACTION

DETEKSI CEPAT DAN SPESIFIK MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MENGGUNAKAN POLYMERASI CHAIN REACTION

Anita Kurniati^{1,3*}, Desak Nyoman Surya Suameitra Dewi², Ni Nyoman Purwani^{1,3}

¹Department of Health, Faculty of Vocational Studies, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia.

²Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya- Indonesia.

³Research Center for Bio-Molecule Engineering, Universitas Airlangga, Surabaya- Indonesia.

Literature Review

Studi Literatur

ABSTRACT

Background: Tuberculosis (TB) is one of the major causes of health burden worldwide, especially in lower middle-income countries. TB is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and characterized by severe condition including coughing and fever. **Purpose:** To review the current methods for detection of TB using Polymerase Chain Reaction (PCR). **Review:** several studies have been done to give valuable insight into TB transmission, diagnosis, and treatment, however research is constantly needed to decrease the incidence of eradicate TB. This infectious disease still give big health problem in all over the world by being second in causing high mortality rates after HIV/AIDS. A specific, sensitive, rapid and cheap method for TB and other mycobacteria diagnosis in clinical specimen is a desperate needed in the laboratory diagnosis and hence management of tuberculosis. PCR as one of nucleic acid amplification assays have revolutionized MTB detection. Since it was first invented in fifteen years ago, it's been through many developments. **Conclusion:** PCR is one of the most specific and sensitive method currently available for TB diagnosis that can also detect in all types of specimens obtained from TB patients.

ABSTRAK

Latar belakang: Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyebab masalah kesehatan di dunia, terutama di negara-negara berpenghasilan menengah kebawah. TB disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) yang ditunjukkan dengan gejala batuk parah dan demam. **Tujuan:** untuk mereview metode terbaru untuk mendeteksi TB dengan metode Hiridisasi Asam Nukleat (PCR). **Tinjauan pustaka:** Beberapa penelitian terakhir telah memberikan ulasan yang berharga tentang penularan, diagnosis, dan pengobatan TB, namun penelitian lanjutan masih terus dilakukan untuk mengurangi angka kejadian dan pengobatan yang efektif untuk memberantas TB. Penyakit ini masih memberatkan kesehatan masyarakat, karena menempati urutan kedua setelah HIV/AIDS dalam menyebabkan tingkat kematian yang tinggi. Metode spesifik, sensitif, cepat, dan ekonomis untuk diagnosis *M. tuberculosis* dan mikobakteria lain dalam spesimen klinis merupakan kebutuhan mendesak saat ini dalam diagnosis laboratorium dan karenanya penatalaksanaan TB. Tes amplifikasi asam nukleat termasuk PCR merupakan

ARTICLE INFO

Received 28 September 2019

Accepted 28 Oktober 2019

Online 31 November 2019

*Korespondensi (Correspondence):
Anita Kurniati

E-mail:
anitakurniati@vokasi.unair.ac.id

Keywords:

Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; HIV/AIDS; Rapid test; PCR

salah satu metode untuk deteksi *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) dan telah diteliti sejak sekitar lima belas tahun yang lalu. **Kesimpulan:** Uji PCR merupakan alat yang sangat spesifik dan sensitif yang tersedia saat ini untuk diagnosis Tuberkulosis di semua jenis spesimen yang diperoleh dari pasien TB baik yang menyerang paru maupun non-paru.

Kata kunci:

Tuberkulosis; *Mycobacterium tuberculosis*; HIV/AIDS; Rapid test; PCR

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit tertua dan salah satu penyebab mortalitas diantara penyakit infeksi lainnya walau penggunaan vaksin yang dilemahkan dan beberapa antibiotik telah digunakan secara luas. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia pada tahun 2016, ada 10,4 juta kasus baru TB di seluruh dunia yang mengakibatkan 1,8 juta kematian dan lebih dari 95% berasal dari negara berpenghasilan rendah dan menengah (WHO, 2016). Vaksin dan obat baru diperlukan untuk membendung epidemi TB di seluruh dunia yang telah membunuh dua juta orang setiap tahun. Oleh karena itu penelitian untuk mempelajari genetika dan fisiologi dari *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) dan mikobakteria lainnya masih diperlukan. Salah satu yang mendapat perhatian penting adalah bagaimana bakteri penyebab tuberkulosis ini menghindari pertahanan sel inang dan menyebabkan penyakit. Beberapa teknik baru yang ada meliputi optimalisasi media kultur termasuk optimalisasi sistem kultur; deteksi pertumbuhan dini; dan pemanfaatan spektrometri massa desorpsi laser yang dibantu matriks/ionisasi (MALDI-TOF-MS) untuk indentifikasi struktur penyusun dinding sel bakteri (Godbhane, 2014). Tes diagnostik baru mulai dikembangkan, seiring tuntutan untuk menemukan metode yang membutuhkan peningkatan kecepatan, efisiensi biaya, kemudahan penggunaan, keselamatan pasien serta akurasi diagnostik (Cho, 2015). Teknologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) diperkenalkan pada pertengahan 1990-an dan telah digunakan untuk diagnosis penyakit menular. Teknik ini umumnya digunakan di laboratorium rutin di negara-negara industri untuk deteksi cepat dan spesifik kompleks *Mtb* pada spesimen klinis.

TELAAH PUSTAKA

Pada awal kemunculannya pasien yang terinfeksi Tuberkulosis (TB) hanya disarankan untuk tidur dan makan makanan bergizi (Engstrom, 2016). Penyakit ini umumnya menyerang organ paru-paru yang ditandai dengan batuk, demam dan nyeri dada. Penyakit misterius ini, yang namanya berasal dari bahasa Latin menjadi lebih dipahami ketika ahli mikrobiologi Jerman, Robert Koch mengumumkan bahwa *Mtb* menyebabkan TB pada tahun 1882. Temuan revolusioner ini, bersama dengan penemuan-penemuan tuberkulin pada tahun 1890 dan vaksin Bacillus-Calmette Guérin (BCG) pada tahun 1908 dan obat-obatan antituberkulosis yang dimulai pada

tahun 1943, menawarkan harapan untuk pemberantasan penyakit yang lebih mematikan daripada plak.

Tuberkulosis tidak hanya menyerang paru-paru, namun dapat juga menyerang tulang dan menyebabkan kelainan pada bentuk tulang. Jaringan tulang dapat dipertahankan selama ribuan tahun, sehingga mampu menjadi bahan pemeriksaan pada pasien TB tulang yang meninggal lebih dari 4.000 tahun yang lalu. Tingkat morbiditas dan kematian karena TB terus mengalami pengurangan pada abad ke-20 di negara maju, dibantu oleh praktik kesehatan masyarakat yang lebih baik dan penggunaan vaksin *M. bovis* BCG secara luas, serta pengembangan antibiotik pada 1950-an.

Tren penurunan tersebut kemudian mulai berhenti dan jumlah kasus baru meningkat kembali pada pertengahan 1980-an. Penyebab utama dari fenomena tersebut dikarenakan angka tunawisma dan kemiskinan di negara berpenghasilan rendah mulai meningkat dan munculnya penyakit AIDS, dimana respons imun pada orang koinfeksi dilemahkan oleh serangan virus. Pengeluaran biaya yang besar dan penggerakkan sumber daya manusia secara besar-besaran, terutama dengan pengiriman antibiotik yang dipantau secara langsung, membuat “epidemi mini” kasus TB baru dapat diredam di wilayah Amerika Serikat dan Eropa (Frieden, 1995; Comas, 2009; Goldman, 2011). Namun negara-negara berpenghasilan menengah dan rendah masih menderita TB. Baru-baru ini studi yang dilakukan oleh Lisdawati (2014) mengungkap epidemiologi molekuler TB dan menunjukkan keragaman genetik yang tinggi dan bervariasi berdasarkan aspek geografis dan menemukan bahwa galur Beijing adalah galur dominan di Indonesia (Nurwidya et al., 2018). Cepheid Xpert® MTB/RIF (Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA, USA).

Belum ada penjelasan sistematis mengenai apa yang membuat *Mtb* menjadi virulen, terlepas dari pengetahuan yang diperoleh dalam 100 tahun terakhir atau lebih. Spesies *M. tuberculosis* tidak memiliki faktor virulensi klasik seperti yang merupakan penyebab utama penyakit karena patogen bakteri lain, misalnya, racun yang dihasilkan oleh *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, and *Vibrio cholera* (Smith, 2003). Sementara pengetahuan tentang bagaimana *Mtb* menyebabkan penyakit masih terbatas. Pandangan kuantitatif ini kemudian dapat digunakan untuk memastikan efek memodifikasi bakteri pada proses penyakit. Istilah standar “mortalitas” dan “morbiditas” digunakan untuk deskripsi virulensi *Mtb* dan dapat didefinisikan dengan cara-cara berikut: mortalitas adalah presentase hewan yang terinfeksi yang mati dan juga

diukur sebagai waktu yang diambil oleh hewan untuk mati setelah terinfeksi.

Parameter penting lain yang biasanya dikaitkan dengan virulensi adalah jumlah atau beban bakteri, yaitu jumlah bakteri yang ditemukan dalam inang yang terinfeksi setelah infeksi awal. Informasi ini memungkinkan perbandingan kesesuaian strain bakteri yang berbeda untuk bertahan hidup dari respon inang selama infeksi. Selain itu, virulensi mutan *Mtb* yang memiliki muatan bakteri lebih rendah selama infeksi hewan menunjukkan kurva pertumbuhan yang berbeda selama proses ini; dalam satu publikasi, mereka dikelompokkan ke dalam berbagai kelas: sgiv (untuk “pertumbuhan parah in vivo”) (mutan yang tidak mereplikasi sama sekali dalam berbagai kelas (Kaushal, 2002; Lathigra, 1996).

Penelitian mengenai gen-gen virulensi pada *M. tuberculosis* telah berkembang dengan cukup pesat. Banyak penelitian yang memaparkan bahwa ESAT-6 dan CFP-10 yang bagian dari ESX-1 secretion system merupakan virulensi utama dari *M. tuberculosis*. ESX-1 secretion system merupakan kepanjangan dari ESAT-6 secretion system. ESX-1 secretion system merupakan fragment sebesar 9,5 kb yang hilang di BCG dan mengkode beberapa gen dari tipe VII secretion system (T7SS) (Teutschbein et al., 2009; Forrellad et al., 2013). Sekresi ESX-1 dibutuhkan pada tahap replikasi awal dari bakteri dan sebagai faktor virulensi, serta terdapat berbagai macam aktivitas lainnya yang mendukung kinerja 2 substrat utama (*esxA* dan *esxB*) dari ESX-1 (Chen et al., 2010).

Protein ESAT-6 dan CFP-10 merupakan kedua protein yang dibutuhkan untuk virulensi penuh dari spesies *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC). Gen yang mengkode ESAT-6 dan CFP-10 berada di segmen yang disebut dengan Region of Difference (RD1). Gen *esxA* (gen pengkode protein ESAT-6) dan *esxB* (gen pengkode CFP-10) pada ESX-1 ditengarai memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai target anti-virulence drugs dan sebagai target diagnostik pada tuberkulosis. Kedua gen yang disekresi ESX-1 tersebut merupakan faktor virulensi yang paling sering dipelajari. Kedua gen tersebut merupakan milik dari keluarga WxG100 dari protein helical kecil yang kekurangan sekresi signal Sec atau Tat dan membentuk heterodimer yang terdiri dari dua rantai dengan panjang sekitar 100 residu (Korotkova et al., 2015; Forrellad et al., 2013).

Protein ESAT-6 dan CFP-10 merupakan dua protein sekresi kecil (antigen) yang dominan dikenali oleh T-cells. Kedua protein tersebut sangat diperlukan dalam memberikan efek virulensi yang penuh dari spesies *M. tuberculosis complex* (Uplekar et al., 2011; Forrellad et al., 2013; Solans et al., 2014). Protein ESAT-6 diketahui dapat mengganggu imunitas dari host, seperti mengganggu aktivasi dari makrofag host dan menginduksi terjadinya apoptosis (Yu and Xie, 2012).

PEMBAHASAN

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan metode untuk mengamplifikasi asam nukleat dengan menggunakan perbedaan suhu untuk menggandakan DNA yang menjadi target. PCR digunakan sebagai alat yang digunakan untuk aplikasi non medis dan juga medis. Dalam aplikasi medis mikrobiologi, PCR digunakan sebagai diagnostik untuk mendeteksi atau mengkarakterisasi penyakit dari sampel spesimen pasien (Schuller et al., 2010).

Prosedur dasar PCR untuk tujuan tertentu, seperti hot-start yang merupakan teknik untuk meningkatkan spesifitas, reverse transcriptase PCR (rt-PCR) yang memungkinkan untuk mengamplifikasi target DNA, dan nested PCR yang dirancang untuk mendapatkan tingkat sensitivitas yang lebih tinggi dari PCR konvensional (Garibyan and Avashia, 2013; Singleton, 2000). Menurut Singleton (2000) terdapat tujuh tipe PCR, yaitu: asymmetric PCR, hot-start PCR, in situ PCR, multiplex PCR, nested PCR, hemi-nested (semi-nested) PCR, dan reverse transcriptase PCR.

Diagnosis laboratorium tergantung pada metode hapusan basil tahan asam (BTA) dapat memberikan hasil dalam waktu 24 jam. Namun, apusan tidak terlalu spesifik untuk *Mtb* dan juga membutuhkan 103 hingga 104 organisme per mL dahak. Kultur bakteri lebih unggul daripada BTA, baik dari segi sensitivitas dan spesifitas. Tetapi, karena mikobakteri memiliki persyaratan pertumbuhan yang sangat ketat, metode diagnostik berbasis kultur berlangsung lebih lambat. Lebih lanjut, diagnosis yang melibatkan pemeriksaan radiologis dan uji Tuberkulin membantu mendeteksi penyakit ini sampai taraf tertentu, tetapi tidak terlalu dapat diandalkan dalam kasus TB luar paru. Mengingat hal ini, diagnosis TB yang akurat dan dini adalah langkah penting dalam penatalaksanaan dan pengendalian TB (Amin, 2011; Engstrom, 2016; Yamamoto, 2017).

Reaksi rantai polimerase sejauh ini merupakan metode yang sangat berguna untuk deteksi cepat DNA mikobakteri dalam spesimen klinis seperti dahak, lavage bronkial, cairan serebrospinal (CSF), dan cairan asites. Beberapa kelompok peneliti telah melaporkan penggunaan metode PCR, dengan variasi pada sensitifitas dan spesifitasnya, hal ini mungkin dikarenakan perbedaan penyiapan sampel, serta metode PCR yang digunakan (Brisson-Noel, 1989; Eisenach, 1990; Forbes, 1993; Pierre, 1991; Saboor, 1992; Shankhar, 1991; Sjöbring, 1990).

Diagnosis pasti infeksi tuberkulosis dan mikobakteriosis mikobakteri nontuberkulosis (NTM)) selalu menjadi masalah serius. Metode ini juga memiliki keterbatasan mereka sendiri karena variasi spesifik wilayah dalam genom mikobakteria. Penelitian yang dilakukan oleh Kabir (2017) menggambarkan uji PCR

menggunakan penanda DNA spesifik- *M. tuberculosis* yang mencakup 165, 365, dan 541 bp fragmen target dari tiga gen yang tidak terkait, yaitu, hsp 65, dnaJ dan elemen penyisipan IS 6110, dari *Mtb* pada pasien yang dicurigai menderita tuberkulosis dari Kolkata, India. Mempertimbangkan peningkatan infeksi mikobakteri yang diakibatkan oleh kemunculan NTM selama beberapa dekade terakhir, ada juga kebutuhan untuk metode yang dapat mendeteksi hampir semua organisme mikobakteri yang ada dalam jumlah kecil dalam sampel klinis yang dicurigai terlepas dari afiliasi spesies mikobakteri.

Penelitian yang dilakukan oleh Singh dan Kashyap (2012) yang bertujuan untuk mendeteksi dan membedakan infeksi *Mtb* dengan memilih sekuens target yang sesuai, yang idealnya terdapat pada semua spesies mikobakteri (kompleks *Mtb*) dan tidak ada pada spesies lain. Metode Amplifikasi tiga sekuens target dari gen yang tidak terkait, yaitu, hsp 65 (165 bp), dnaJ (365 bp), dan elemen penyisipan IS 6110 (541 bp) oleh PCR dilakukan dalam sampel klinis dari kasus yang diduga TB/ mikobakteriosis dan sehat, kontrol, dan Hasil.

Sensitivitas metode yang digunakan berkisar antara 73,33% hingga 84,61%, dan spesifisitasnya adalah 80%. Metode PCR secara signifikan lebih baik daripada metode *smear* dan kultur. Sementara itu, Theron (2017) membandingkan berbagai tes laboratorium dan mengevaluasi IS6110 PCR untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) di antara pasien TB anak yang didiagnosis secara klinis. Sebanyak 102 pasien anak (<15 tahun) dengan TB yang didiagnosis secara klinis. Sputum/sampel muntahan dikumpulkan untuk mikroskop *smear*, kultur (media padat/Lowenstein-Jensen dan cairan/MGIT), dan pengujian PCR IS6110.

Sensitivitas, spesifisitas, dan prediksi positif dan negatif nilai (PPV, NPV) dari *smear* microscopy dan PCR dibandingkan dengan dua metode kultur. Hasil: tiga pasien positif menggunakan mikroskop *smear* (2,9%). Spesies *M. tuberculosis* terdeteksi secara konvensional kultur di 15,7% (16/102), kultur cair di 14% (14/100), dan IS6110 PCR di 61,8% (63/102). Metode PCR mendeteksi suatu tambahan 45 pasien yang tidak terdeteksi dengan tiga tes lainnya. Dibandingkan dengan konvensional dan kultur cair, masing-masing, mikroskop *smear* menunjukkan sensitivitas 18,8% dan 21,4%, spesifisitas 100% secara individual, PPV 100% secara individual, dan NPV 86,9% dan 88,7%, sedangkan PCR memiliki sensitivitas 87,5% dan 92,9%, spesifisitas masing-masing 43%, PPV 22,2% dan 21%, dan NPV 94,9% dan 97,4%.

Vinuesa et al. (2014) melakukan studi dengan metode kohort intervensi prospektif. Spesimen pernapasan dari 1.020 pasien diperiksa dengan mikroskop menggunakan metode BTA, diuji dengan metode PCR *RealTime* (RT-PCR)/ MTB PCR, dan dikultur dalam media mikobakteri. Tujuh belas pasien dinyatakan positif oleh PCR (5 positif dengan uji BTA dan 12 menunjukkan hasil negatif). Pasien yang dites positif dengan PCR dan negatif dengan kultur (n = 5) dirawat dan dianggap telah menanggapi terapi antituberkulosis. Tidak ada kasus PCR-negatif/kultur-

positif, dan tidak ada pasien yang dites positif untuk mikobakteria nontuberkulosis (n = 20) yang menghasilkan hasil PCR positif. Data menunjukkan bahwa pengujian rutin spesimen paru dari pasien dengan dengan metode RT TBC yang meningkatkan hasil diagnostik TBC dan dapat mengurangi waktu untuk memulai pengobatan antituberkulosis.

Horita, et al. (2015) melakukan penelitian mengenai sensitivitas COBAS TaqMan *Mtb* (CTM) untuk deteksi *Mtb* dan *Mtb* kompleks, menggunakan model bivariat untuk meta-analisis. Didapatkan hasil untuk spesimen pernapasan BTA positif, sensitivitasnya adalah 0,952 (95% CI 0,926-0,969) dan spesifisitasnya 0,916 (95% CI 0,797-0,968). Untuk spesimen pernapasan BTA negatif, sensitivitas dan spesifisitas masing-masing adalah 0,600 (95% CI 0,459-0,726) dan 0,989 (95% CI 0,981-0,993). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa target gen *esxA* memiliki nilai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Singh et al. (2007) dan Desak et al. (2017) memperlihatkan bahwa target gen *esxA* mampu mendeteksi *M. tuberculosis* dengan baik dan spesies nontuberculous mycobacteria (NTM) menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak adanya pita DNA setelah dilakukan proses elektroforesis.

KESIMPULAN

Uji PCR merupakan alat yang sangat sensitif dan spesifik yang tersedia saat ini untuk diagnosis tuberkulosis di semua jenis spesimen yang diperoleh dari pasien TB baik yang menyerang paru maupun non-paru. Metode tersebut dapat menjadi diagnostik pendamping dari diagnostik gold standard TB, yaitu metode kultur, BTA, dan uji rapid SD Bioline TB Ag MPT64 (identifikasi biokimia).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang terlibat dan membantu dalam studi literatur ini. Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam studi literatur ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, I., Idrees, M., Awan, Z., Shahid, M., Afzal, S., Hussain, A. 2011. PCR could be a method of choice for identification of both pulmonary and extrapulmonary tuberkulosis. BMC Res Notes Vol 4. Pp. 332.
- Brisson-Noel, A., D. Lecossier, X. Nassif, B. Giquel, V. Levy-Frebault, A. J. Hance. 1989. Rapid diagnosis of tuberkulosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet Vol. 334(8671). Pp. 1069–1072.
- Chen, J. M., Pojer, F., Blasco, B., Cole, S. T. 2010. Towards anti-virulence drugs targeting *esx-1* mediated pathogenesis

- of *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms; Mycobacterial infections* Vol. 7(1). Pp. 25-31
- Cho, W.H., Won, E.J., Choi, H.J., Kee, S.J., Shin, J.H., Ryang, D.W., et al. 2015. Comparison of AdvanSure TB/NTM PCR and COBAS TaqMan MTB PCR for detection of mycobacterium tuberculosis complex in routine clinical practice. *Ann Lab Med*. Vol. 35. Pp. 356–361.
- Comas, I., Gagneux, S. 2009. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog*. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000600>. Accessed: November 2014
- Desak, T. N., Soedarsono, Kurniati, A., Mertaniasih, N. M. 2017. The specific DNA region of *esxA* gene for the target of PCR to determine *Mycobacterium tuberculosis* accurately. *Bali Medical Journal*. Vol. 6(1). Pp. 150-155.
- Eisenach, K. D., Cave, M. D., Bates, J. H., Crawford, J. T. 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis*. Vol. 161(5). Pp. 977–981.
- Engström, A. 2016. Fighting an old disease with modern tools: characteristics and molecular detection methods of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Dis (Lond)*. Vol. 48. Pp. 1-17.
- Forbes, B. A., Hicks, K. E. 1993. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*. Vol. 31(7). Pp. 1688–1694.
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio, y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz, Santangelo, M., Cataldi, A. A., Bigi, F. 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. Vol. 4(1). Pp. 3-66.
- Frieden, T. R., Fujiwara, P. I., Washko, R. M., Hamburg, M. A. 1995. Tuberculosis in New York City—turning the tide. *N. Engl. J. Med*. Vol. 333(4). Pp. 229–233.
- Garibyan, L., Avashia, N. 2013. Polymerase chain reaction. *J. Investigative Dermatology* Vol. 133(3). Pp. 1-4.
- Godhane, R., Raoult, D., Drancourt, M. 2014. Dramatic reduction of culture time of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. Vol. 4. Pp. 4236.
- Goldman, L., Schafer, A. I. 2011. Tuberculosis: disease overview. In: Goldman L, Schafer AI, editors. *Goldman's Cecil medicine: expert consult premium edition 24th ed*. St. Louis (MO): Saunders Elsevier.
- Horita, N., Yamamoto, M., Sato, T., Tsukahara, T., Nagakura, H., Tashiro, K., Shibata, Y., Watanabe, H., Nagai, K., Nakashima, K., Ushio, R., Ikeda, M., Sakamaki, K., Yoshiyama, T., Kaneko, T. 2015. Sensitivity and specificity of Cobas TaqMan MTB real-time polymerase chain reaction for culture-proven *Mycobacterium tuberculosis*: meta-analysis of 26999 specimens from 17 Studies. *Sci Rep*. Vol. 5. Pp. 18113.
- Kabir, S., Uddina, M.K.M., Chistib, M.J., Fannanac, T., Haqued, M.E., Uddine, M.R., MSayera Banua, M.S., Ahmed, T. 2018. Role of PCR method using IS6110 primer in detecting *Mycobacterium tuberculosis* among the clinically diagnosed childhood tuberculosis patients at an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. *International Journal of Infectious Disease* Vol. 68. Pp. 108-114.
- Kaushal, D., B., G. Schroeder, S., Tyagi, T. Yoshimatsu, C. Scott, C. Ko, L. Carpenter, J. Mehrotra, Y. C. Manabe, R. D. Fleischmann, and W. R. Bishai. 2002. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 99(12). Pp. 8330–8335.
- Korotkova, N., Piton, J., Wagner, J. M., Boy-Röttger, S., Aleksandre, J., Evans, T. J, Cole, S. T, Pojer, F., Korotkov, K. V. 2015. Structure of EspB, a secreted substrate of the ESX-1 secretion system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Structural Biology*. Vol. 191(2). Pp. 236-244.
- Lathigra, R., Zhang, Y., Hill, M., Garcia, M.-J., Jackett, P. S., Ivanyi, J. 1996. Lack of production of the 19-kDa glycolipoprotein in certain strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol*. Vol. 147(4). Pp. 237–249.
- Lisdawati, V., Puspandari, N., Rif'ati, L., Soekarno, T., Melatiwati, M., Syamsidar, K., Ratnasari, L., Izzatun, N., Parwati, I. 2015. Molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* and its susceptibility to anti-tuberculosis drugs in Indonesia. *BMC Infect Dis*. Vol. 15. Pp. 366.
- Nurwidya, F., Handayani, D., Burhan, E., Yunus, F. 2018. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam Medical Journal* Vol. 54(1). Pp. 1-9.
- Pierre, C., Lecossier, D., Boussoignant, Y., Bocart, D., Joly, V., Yeni, P., Hance, A. J. 1991. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J. Clin. Microbiol*. Vol. 29(4). Pp. 712–717.
- Saboor, S. A., Johnson, N. M., McFadden, J. 1992. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet* Vol. 339(8800). Pp. 1012–1015.
- Schuller, M., Sloots, T. P., James, G. S., Halliday, C. L., Carter I. W.J. 2010 PCR for Clinical Microbiology an Australian and International Perspective. Springer Science+Business Media. New York.
- Shankhar, P., Manjunath, N., Mohan, K. K., Shriniwas, Praasad, K., Behari, M., Ahuja. G. K. 1991. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* Vol. 337(8732). Pp. 5–7.
- Singh, S., Gopinath, K., Shahdad, S., Kaur, M., Singh, B., Sharma, P. 2007. Nontuberculous mycobacterial infection in Indian AIDS patients detected by a novel set of ESAT-6 polymerase chain reaction primers. *Japanese Journal of Infectious Disease*. Vol. 60(1). Pp. 14-18.
- Singh, A., Kashyap, V. K. 2012. Specific and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. Vol. 2012. Id. 654694.
- Singleton, P. 2000. *DNA Methods in Clinical Microbiology*. Springer Science+Business Media. Dordrecht.
- Sjöbring, U., Mecklenburg, M., Andersen, A. B., Möller, H. 1990. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. Vol. 29(10). Pp. 2200–2204.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. American Society for Microbiology Vol. 16(3). Pp. 463-496
- Solans, L., Aguiló, N., Samper, S., Pawlik, A., Frigui, W., Martín, C., Brosch, R., Gonzalo-Asensio, J. 2014. A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Journal Infection and Immunity*. Vol. 82(8). Pp. 3446-3456.
- Teutschbein, J., Schumann, G., Möllmann, U., Grabley, S., Cole, S.T., Munder, T. 2009. A protein linkage map of the ESAT-6 secretion system 1 (ESX-1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological Research*. Vol. 164. Pp. 253-259.
- Theron, G., Peter, J., Calligaro, G., Meldau, R., Hanrahan, C., Khalife, H., Brian Matinyanya, B., Muchinga, T., Smith, L.,

- Pandie, S., Lenders, L., Patel, V., Mayosi, B.M., & Dheda, K. 2014. Determinants of PCR performance (Xpert MTB/RIF), including bacterial load and inhibition, for TB diagnosis using specimens from different body compartments. Available from: www.nature.com/scientificreports. Accessed: 20 October 2019.
- Uplekar, S., Heym, B., Friocourt, V., Rougemont, J., Cole, S. T. 2011. Comparative genomics of *esx* genes from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* provides evidence for gene conversion and epitope variation. *Journal Infection and Immunity* Vol. 79(10). Pp. 4042-4049.
- Vinuesa, V., Borrás, R., Briones, M.L., Clari, M.A., Cresencio, V., Giménez, E., Muñoz, C., Oltra, R., Servera, E., Scheelje, T., Tornero, C., Navarro, D. 2014. Performance of a Highly Sensitive *Mycobacterium tuberculosis* Complex Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in a Low-Prevalence Setting: a Prospective Intervention Study. *Journal of Clinical Microbiology* Vol 56(5). Pp. 116-18.
- WHO. 2016. Tuberculosis Global Report. Available from: http://www.who.int/tb/Global_TB_Facts.pdf?ua=1. Accessed: 18 October 2016.
- Yamamoto, M., Ushio, R., Watanabe, H., Tachibana, T., Masatsugu, Tanaka, Tomoyuki, Yokose, T., Tsukijie, J., Nakajima, H., Kaneko, T., 2017. Detection of *Mycobacterium tuberculosis*-derived DNA in circulating cell-free DNA from a patient with disseminated infection using digital PCR. *International Journal of Infectious Diseases* Vol. 66. Pp. 80-82.
- Yu, X., Xie, J. 2012. Roles and underlying mechanisms of ESAT-6 in the context of *Mycobacterium tuberculosis*-host interaction from a systems biology perspective. *Cellular Signalling* Vol. 24(9). Pp. 1841-1846.