

Gambaran Infeksi *Nontuberculous Mycobacteria* (NTM) pada Penderita Suspek TB Paru Menggunakan *Multiplex PCR (MPCR)-Universal Lateral Flow Assay (ULFA) Kit*

Putri Wulan Akbar^{1,2}, Agustin Iskandar³, Tri Wahyu Astuti⁴, Kristin Indriana⁵

ABSTRAK

Infeksi paru akibat *Nontuberculous Mycobacteria* (NTM) dan *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) dapat memberikan gambaran klinis yang serupa sehingga berpotensi menyebabkan kesalahan diagnosis dan terapi. Pemeriksaan *Multiplex PCR (MPCR)-Universal Lateral Flow Assay (ULFA)* merupakan pemeriksaan berbasis molekuler untuk mendeteksi gen *rpoB*, *IS1660* dan *mtp40* yang dapat digunakan untuk membedakan infeksi NTM dari infeksi TB. **Tujuan:** Mendapatkan gambaran infeksi NTM menggunakan MPCR-ULFA pada penderita terduga TB paru. **Metode:** Penelitian ini merupakan studi deskriptif dengan pendekatan potong lintang yang dilaksanakan sejak April sampai Juli 2019. Sebanyak 39 sampel sputum dari pasien terduga TB paru dari RSUD Kanjuruhan Kapanjen, Kabupaten Malang diperiksa apusan BTA, GeneXpert dan MPCR-ULFA. **Hasil:** Sebanyak 5 sampel (12,8%) sputum dari pasien terduga TB paru terdeteksi sebagai NTM positif menggunakan pemeriksaan MPCR-ULFA. Empat dari lima sampel (80%) tersebut memiliki kesesuaian dengan hasil GeneXpert dan apusan BTA, yakni MTB negatif. Pemeriksaan molekuler baik GeneXpert maupun MPCR-ULFA keduanya mendeteksi keberadaan gen *rpoB* dari *Mycobacterium*. Metode MPCR-ULFA mengamplifikasi 3 gen target sekaligus (*IS1660*, *mtp40* dan *rpoB*) sehingga dapat mendeteksi infeksi NTM atau MTB. **Simpulan:** Prevalensi NTM pada pasien terduga TB paru di RSUD Kanjuruhan Kapanjen menggunakan MPCR-ULFA mencapai 12,8%. Sebanyak 80% dari NTM positif memiliki hasil pemeriksaan GeneXpert dan apusan BTA negatif.

Kata kunci: GeneXpert, MPCR-ULFA, NTM, suspek TB paru

ABSTRACT

Pulmonary infections caused by Nontuberculous Mycobacteria (NTM) and Mycobacterium Tuberculosis (MTB) can show similar clinical manifestations. These could potentially mislead the diagnoses and increase the unnecessary side effects of therapy. Multiplex PCR (MPCR)-Universal Lateral Flow Assay (ULFA) is a molecular-based examination using three genes (rpoB, IS1660 dan mtp40) as a target of amplification. This method could be used to differentiate NTM from TB infections. Objectives: To obtain data of NTM infection in lung TB-suspected patients using MPCR-ULFA kit. Methods: This research was a descriptive study with cross-sectional design, which was conducted from April-July 2019. A total of 39 sputum samples of patients with suspected pulmonary tuberculosis from RSUD Kanjuruhan, Kapanjen, Malang were required for AFB smear, GeneXpert and MPCR-ULFA tests. Results: Five of 39 samples (12.8%) of TB suspected the patient showed positive NTM results by MPCR-ULFA. About 80% of them have negative AFB smear and GeneXpert results. Molecular examinations, both GeneXpert and MPCR-ULFA could detect the presence of the rpoB gene in Mycobacterium. MPCR-ULFA can amplify 3 genes target (IS1660, MTP40 and rpoB) simultaneously, thus can distinguish NTM from MTB infection in one examination. Conclusion: The prevalence of NTM infection in lung TB-suspected patients reaches 12.8%. Of these, 80% showed a negative result of the GeneXpert and smear microscopy examination.

Keywords: GeneXpert, MPCR-ULFA, NTM, lung TB suspects

Affiliasi penulis: ¹Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang, Indonesia. ²Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia ³Dept. Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya/RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang, Indonesia. ⁴Dept. Pulmonologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya/RSUD Dr. Saiful Anwar, Malang, Indonesia. ⁵Instalasi Laboratorium RSUD Kanjuruhan Kepanjen, Kabupaten Malang, Indonesia.

Korespondensi: Putri Wulan Akbar, Email: nyirawan@gmail.com
Telp: 082233678395

PENDAHULUAN

Nontuberculous Mycobacteria (NTM) disebut juga sebagai *Mycobacteria Other Than Tuberculosis* (MOTT) atau *Atypical Mycobacteria* merupakan semua spesies dalam famili *Mycobacterium* yang dapat menyebabkan penyakit, selain dari *Mycobacterium tuberculosis complex* (antara lain: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. orygis*, and *M. pinnipedii*) dan *M. leprae*. Genus ini terdiri atas lebih dari 120 spesies dan terdistribusi luas di seluruh dunia dengan variasi patogenisitas, virulensi, daya adaptasi di lingkungan, dan juga respon terhadap pengobatan.^{1,2}

NTM merupakan bakteri oportunistik yang banyak ditemukan di air dan tanah. Kuman ini sering menginfeksi pasien yang sudah memiliki penyakit paru sebelumnya, pasien dengan defisiensi imun, maupun pasien dengan penyakit kronis lainnya.² Di seluruh dunia prevalensi infeksi akibat NTM cenderung mengalami peningkatan. Keberadaan NTM menjadi perhatian setelah terjadinya epidemi AIDS. Di negara-negara maju yang non-endemik TB, infeksi NTM bertanggungjawab atas sebagian besar infeksi *Mycobacteria*, baik pada individu imunodefisiensi maupun imunokompeten.³ Di negara endemik TB, insidensi dari NTM jarang dilaporkan. Diperkirakan jumlah kasus infeksi NTM di negara endemik TB jauh lebih tinggi.^{4,5} Diagnosis NTM yang seringkali terlupakan menyebabkan ketidaksesuaian rejimen terapi, biaya pengobatan yang tinggi, dan stigma dari masyarakat yang berpengaruh pada sosio-ekonomi penderita.⁶

Pada praktek klinis, infeksi paru akibat *M. tuberculosis* dan NTM sukar dibedakan. Manifestasi klinis keduanya seringkali mirip dan tumpang tindih.

Infeksi NTM dapat bermanifestasi sebagai bronkopulmoner kronis, limfadenitis, infeksi kulit dan jaringan lunak lainnya. Gejala dari infeksi NTM dapat berupa demam, menggigil, keringat malam, kehilangan berat badan, nyeri abdomen, *fatigue*, diare, pembesaran kelenjar getah bening, dan anemia. NTM memiliki manifestasi klinis yang mirip, namun regimen terapi NTM berbeda dengan TB. NTM relatif resisten terhadap antibiotik dan dapat menjadi lebih resisten bila diobati dengan satu macam antibiotik saja. Terapi standar NTM meliputi 3-4 macam antibiotik (rifampisin, ethambutol, dan makrolida seperti azithromycin atau clarithromycin) dan berlangsung dalam jangka panjang, yakni 18-24 bulan.^{2,4,7}

Penegakan diagnosis dari NTM didasarkan pada keluhan dan gejala klinis pasien, gambaran radiologis baik foto thorax maupun *CT scan*, dan deteksi spesies NTM melalui kultur dan metode PCR.⁷ Pemeriksaan MPCR-ULFA (*Multiplex PCR- Ultra Lateral Flow Assay*) merupakan pemeriksaan berbasis molekuler dengan amplifikasi tiga gen target sekaligus (IS1660, mtp40, dan rpoB). Tes ini dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan MTB sekaligus NTM pada pasien dengan dugaan TB paru. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan gambaran infeksi NTM pada pasien terduga TB paru yang diperiksa dengan MPCR-ULFA.

METODE

Penelitian ini merupakan studi deskriptif dengan pendekatan potong-lintang yang dilaksanakan sejak April sampai Juli 2019. Sebanyak 39 sampel sputum dari pasien terduga TB paru di RSUD Kanjuruhan Kepanjen, Kabupaten Malang diperiksa apusan BTA, GeneXpert dan MPCR-ULFA. Data yang terkumpul selanjutnya diolah secara komputerisasi dan disajikan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi.

Prosedur pemeriksaan MPCR-ULFA

Prosedur pemeriksaan dimulai dengan ekstraksi DNA dari sampel sputum. Sebanyak 5µl hasil ekstraksi DNA dicampurkan dengan 15µl *master mix* yang terdiri atas 10µl primer dan 5µl 2X PCR premix. Tabung PCR diputar ke bawah (*spinning down*) dalam 3~5 detik, kemudian dilakukan amplifikasi dengan alat MPCR.

Sebanyak 5µl produk PCR dimasukkan ke dalam sumur periksa pada *ULFA Device* lalu ditambahkan 50µl *running buffer* dan 50 µl *washing buffer*.

HASIL

Hasil pemeriksaan akan muncul dan dibaca dalam 15 menit mengikuti Tabel 1. Data hasil penelitian kemudian ditabulasi dalam tabel distribusi frekuensi.

Tabel 1. Pembacaan hasil MPCR-ULFA

Hasil	Pita Deteksi
TB positif	1,2, 4, 5
	1, 4, 5
	2, 4, 5
NTM positif	3, 4, 5
Negatif	4,5
Invalid	5
	<i>No band</i>

Sebanyak 39 sampel sputum dari pasien terduga TB paru diperiksa apusan BTA, GeneXpert dan MPCR-ULFA. Distribusi frekuensi jenis kelamin pasien terduga TB paru hampir seimbang, yakni laki-laki 53,85% dan perempuan 46,15%. Pada usia >15 tahun proporsi jumlah terduga paru terdistribusi merata di

semua kelompok usia. Data karakteristik pasien dijabarkan pada Tabel 2. Terdapat 10 sampel (25,6%) dengan apusan BTA positif MTB dan 11 sampel (28,2%) dengan GeneXpert positif MTB. Pemeriksaan dengan MPCR-ULFA menunjukkan hasil yang lebih bervariasi, yakni 20 sampel negatif, 13 sampel positif, 5 sampel NTM, dan 1 sampel *invalid* (Tabel 3). Empat dari lima sampel NTM (80%) menunjukkan hasil pemeriksaan BTA dan GeneXpert negatif, sedangkan satu sampel memiliki hasil pemeriksaan BTA dan GeneXpert positif. Karakteristik kelima sampel dengan hasil NTM positif dijabarkan di Tabel 4.

Tabel 2. Distribusi frekuensi jenis dan usia pasien terduga TB paru

Karakteristik		n=39
Jenis kelamin	Laki-Laki	21 (53,85%)
	Perempuan	18 (46,15%)
Usia	<15 tahun	1 (2,6%)
	15-30 tahun	9 (23,1%)
	31-45 tahun	8 (20,5%)
	46-60 tahun	10 (25,6%)
	>60 tahun	11 (28,2%)
Median Usia	51 (26-62) tahun	

Tabel 3. Hasil pemeriksaan sputum pasien terduga TB paru

Pemeriksaan BTA	Jumlah	GeneXpert				MPCR-ULFA				
		Positif (28,2%)			Negatif (71,8%)	Positif (46,2%)		Negatif (51,3%)	Invalid (2,5%)	
		Low	Med.	High		MTB	NTM			
Positif (25,6%)	+	1	1	0	0	0	1	0	0	
	++	1	0	1	0	0	0	1	0	
	+++	8	0	3	5	0	8	0	0	
Negatif (74,4%)		29	1	0	0	28	5	4	19	1
Total		n=39	2	4	5	28	13	5	20	1

Tabel 4. Karakteristik pasien dengan hasil NTM pada pemeriksaan dengan MPCR-ULFA

No.	Usia (tahun)	Jenis Kelamin	BTA mikroskopis	GeneXpert	Karakteristik sputum
1	62	Laki-laki	Negatif	Negatif	Mucous
2	44	Laki-laki	Negatif	Negatif	Mucous
3	12	Perempuan	1+	Low	Mucous
4	42	Laki-laki	Negatif	Negatif	Mucous
5	31	Perempuan	Negatif	Negatif	Mucous

PEMBAHASAN

Jumlah infeksi akibat NTM cenderung mengalami peningkatan. Pasien dengan gangguan struktural paru, seperti: bronchiektasis, PPOK, kistik fibrosis, dan asma memiliki risiko yang lebih besar untuk terinfeksi NTM. Lebih dari 90% pasien dengan bronchiektasis memiliki infeksi NTM aktif saat terdiagnosis. Pasien dengan usia diatas 50 tahun, pasien dengan gangguan imun, serta pasien dengan respon terapi antibiotik yang rendah merupakan kelompok yang rentan terinfeksi NTM.⁸ Identifikasi *Mycobacteria* penting untuk menentukan antibiotik empiris yang diberikan dan mencegah pemberian obat-obatan yang tidak diperlukan untuk pasien.^{2,9}

Infeksi akibat NTM seringkali terkamufase dengan infeksi yang diakibatkan oleh *M. tuberculosis* (MTB). Diagnosis *Multidrug Resistant Tuberculosis* (MDR-TB) dilaporkan bias dengan diagnosis dari NTM pada lebih dari 11% kasus.¹⁰ Kasus infeksi TB dan NTM dapat memberikan gambaran klinis yang serupa. Keduanya dapat mengeluhkan gejala serupa berupa batuk berdahak selama 2-3 minggu atau lebih, sesak nafas, badan lemas, nafsu makan menurun, berat badan menurun, malaise, berkeringat malam hari tanpa kegiatan fisik, demam meriang lebih dari satu bulan. Dalam situasi tersebut pemeriksaan

laboratorium dan mikrobiologi dapat bermanfaat untuk membedakan infeksi MTB dengan NTM.^{7,9,11}

Pemeriksaan mikrobiologi konvensional dengan teknik hapusan memiliki tingkat sensitivitas yang rendah, sedangkan kultur memerlukan waktu yang panjang.¹² Teknik pemeriksaan berbasis molekuler berkembang pesat dalam diagnosis *Mycobacterium*. Teknik ini terbukti lebih cepat dengan tingkat sensitivitas tinggi.¹³ Pemeriksaan dengan multipleks PCR menggunakan tiga primer spesifik untuk meningkatkan kemampuan deteksi MTB dan NTM.¹⁴ Sensitivitas dan spesifitas dari MPCR mencapai 91,9% dan 88,4%.⁸

Sebanyak lima dari 39 (12,8%) sampel sputum pasien terduga paru terdeteksi sebagai NTM melalui pemeriksaan MPCR-ULFA. Pemeriksaan dengan MPCR-ULFA mengamplifikasi tiga gen target, yakni *IS6110* (pita 1), *mtp40* (pita 2), dan *rpo-B* (pita 3). Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan kualitatif dengan tiga tahapan utama. Tahap pertama adalah ekstraksi DNA, dilanjutkan dengan amplifikasi gen menggunakan multipleks PCR, dan pembacaan hasil hibridisasi DNA pada pita membran nitroselulosa.¹⁵ Gen *rpo-B* yang terletak di pita nomor 3 pada alat ULFA merupakan penanda umum untuk bakteri

Mycobacterium, sedangkan gen *IS6110* dan *mtp40* keduanya spesifik untuk MTB. Sekuens insersi *IS6110* merupakan target yang paling umum digunakan dalam deteksi MTB. Sedangkan gen *rpo-B* juga menjadi target pemeriksaan GeneXpert dalam mendeteksi resistensi MTB terhadap rifampisin.^{8,13,16}

Hasil studi ini menunjukkan bahwa 4 dari 5 sampel (80%) yang terdeteksi NTM dengan MPCR-ULFA memiliki kesesuaian dengan hasil GeneXpert dan apusan BTA, dimana keduanya menunjukkan hasil negatif MTB. Pemeriksaan Tes Cepat Molekuler (TCM) dengan GeneXpert merupakan metode berbasis *nested real-time* PCR yang digunakan secara luas untuk mendeteksi keberadaan MTB beserta sensitifitasnya terhadap rifampisin.¹⁷ Primer PCR mengamplifikasi sekitar 81 bp daerah inti gen *rpoB* yang mengkode sub unit β dari polimerase RNA pada kompleks MTB. Beberapa studi menunjukkan bahwa pemeriksaan GeneXpert memiliki performa yang baik dalam membedakan MTB dengan NTM pada *load* bakteri yang rendah.^{11,16}

Hasil pemeriksaan negatif MTB (*MTB not detected*) dari GeneXpert tidak dapat membedakan negatif *Mycobacteria* (MTB maupun NTM) dengan positif NTM. Pada hasil studi ini didapatkan satu sampel positif NTM yang memiliki hasil apusan BTA dan GeneXpert positif. Pang *et al.* menguji kemampuan GeneXpert dalam mengidentifikasi NTM dengan dilusi serial dari jumlah/*load* bakteri (10^8 , 10^6 , 10^4 , dan 10^2 CFU/mL). Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa pada *load* bakteri 10^6 , sebanyak 5 dari 12 spesies NTM teridentifikasi sebagai MTB positif dengan GeneXpert. Dua spesies yakni *M. abscessus* dan *M. smegmatis*, ditandai oleh GeneXpert sebagai MTB dengan Rifampicin resisten. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada *load* bakteri yang tinggi, GeneXpert dapat salah mengidentifikasi spesies NTM sebagai MTB sehingga menghasilkan positif palsu. Kemampuan deteksi GeneXpert paling akurat didapatkan pada *load* bakteri 10^2 .¹¹

Hipotesis lain menyebutkan bahwa gen *rpo-B* pada *Mycobacterium* merupakan gen penjaga dengan sedikit keragaman genetik (*conserved gene*). Tingginya konservasi pada gen ini diperkirakan mengurangi spesifitas deteksi GeneXpert, terutama

pada *load* bakteri yang tinggi.^{18,19} Teknik pemeriksaan konvensional seperti hapusan memiliki sensitivitas yang variatif. Pemeriksaan ini sangat dipengaruhi oleh keterampilan dari pemeriksa dan tidak dapat digunakan untuk membedakan NTM dengan MTB.²⁰ Penelitian dari Raveendran dan Wattal menunjukkan bahwa hasil kultur 6 sampel dengan hasil PCR negatif dan mikrobiologis positif didapatkan sebanyak dua sampel tumbuh sebagai NTM dan empat sisanya tumbuh MTB.¹⁵

SIMPULAN

Prevalensi NTM pada pasien terduga TB paru di RSUD Kanjuruhan Kepanjen menggunakan MPCR-ULFA mencapai 12,8%. Dari jumlah tersebut sebanyak empat sampel (80%) diantaranya memiliki kesesuaian hasil dengan pemeriksaan GeneXpert dan apusan BTA.

SARAN

Penelitian ini menggunakan bahan biologi tersimpan berupa sampel sputum pasien terduga TB sehingga tidak mencakup data klinis pasien. Diharapkan ke depan terdapat penelitian lanjutan dengan data klinis pasien dan penambahan pemeriksaan kultur sputum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Youngkil Park selaku manajer dari *KOICA TB project*. Penelitian ini merupakan hasil kerjasama dengan KOICA (*Korea International Cooperation Agency*) melalui program *Creative Technology Solution (CTS)*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Henkle E, Aksamit T, Barker A, Daley CL, Griffith D, Leitman P, *et al.* Patient-centered research priorities for pulmonary nontuberculous mycobacteria (NTM) infection an NTM research consortium workshop report. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13(9):S379–84.
2. Kumar Gupta P, Gupta K, Rana R, Bhandarkar A. Pulmonary Tuberculosis Versus Pulmonary Non-Tuberculous Mycobacterial Infection. *Journal, Indian Acad Clin Med I.* 2018;19(1).

3. Gopinath K, Singh S. Non-Tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: Are we neglecting the danger? *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(4):1–5.
4. Das S, Garg T, Chopra S, Dasgupta A. Nontuberculous mycobacteria: An update on infections caused, laboratory identification and their treatment. *Infect Dis and Your Heal*. 2018;1(1):225–38.
5. Kim SY, Shin SH, Moon SM, Yang B, Kim H, Kwon OJ, *et al*. Distribution and clinical significance of *Mycobacterium avium* complex species isolated from respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;88(2):125–37.
6. Shahraki AH, Heidarieh P, Bostanabad SZ, Khosravi AD, Hashemzadeh M, Khandan S, *et al*. “Multidrug-resistant tuberculosis” may be nontuberculous mycobacteria. *Eur J Intern Med*. 2015;26(4):279–84.
7. Singhal R, Myneedu VP. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriology*. 2015;4(1):1–6.
8. Loukil A, Kirtania P, Bedotto M, Drancourt M. FISHing mycobacterium tuberculosis complex by use of a *rpoB* DNA Probe Bait. *J Clin Microbiol*. 2018;56(10):1–8.
9. Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease: A systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(11):1370–7.
10. Sali M, De Maio F, Caccuri F, Campilongo F, Sanguinetti M, Fiorentini S, *et al*. Multicenter evaluation of anyplex plus MTB/NTM MDR-TB assay for rapid detection of mycobacterium tuberculosis complex and multidrug-resistant isolates in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol*. 2016;54(1):59–63.
11. Pang Y, Lu J, Su B, Zheng H, Zhao Y. Misdiagnosis of tuberculosis associated with some species of nontuberculous mycobacteria by GeneXpert MTB/RIF assay. *Infection*. 2017; 45 (5):677–81.
12. Pfuetze KH, Hubble R, Henkle E, Aksamit T, Barker A, Daley CL, *et al*. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2016;4(1):1370–7.
13. Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, Beckert P, Kabamba Mukadi B, Mathys V, *et al*. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23 (3): 167–72.
14. Mokaddas E, Ahmad S. Development and evaluation of a multiplex PCR for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from non-tuberculous mycobacteria. *Jpn J Infect Dis*. 2007; 60 (2–3): 140–4.
15. Raveendran R, Wattal C. Utility of multiplex real-time PCR in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Brazilian J Infect Dis [Internet]*. 2016;20(3):235–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.01.006>
16. Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin M, Martín R, Alcaide F. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):1137–9.
17. Piatek AS, Van Cleeff M, Alexander H, Coggin WL, Rehr M, Van Kampen S, *et al*. GeneXpert for TB diagnosis: Planned and purposeful implementation. *Glob Heal Sci Pract*. 2013; 1 (1): 18–23.
18. Maruthai K, Ravibalan T, Vallayyachari K, Kesavan S, Samrot A V, Muthaiah M. Molecular typing and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using Double Repetitive Element PCR and Duplex PCR. *Int J Mycobacteriology*. 2015;4(1):60–6.
19. Tang TH, Ahmed SA, Musa M, Zainuddin ZF. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *World J Microbiol Biotechnol*. 2013;29(12):2389–95.
20. Tadesse M, Aragaw D, Rigouts L, Abebe G. Increased detection of smear-negative pulmonary tuberculosis by GeneXpert MTB/RIF® assay after bleach concentration. *Int J Mycobacteriology*. 2016;5(2):211–8.