**مقاله پژوهشی**

# مطالعه سه روش خالص سازی HBV DNA جهت استفاده در تکنیک PCR

**دکتر نسرین شیخ*، دکتر مسعود حاجیا **، اشرف محمدخانی ***، مسعود کورکی****

**چکیده:**

تشخیص هپاتیت B با توجه به فراوانی میزان عفونت ناشی از آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در بین روشهای تشخیصی، اخیراً تکنیک PCR بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. گزارش های ارائه شده در مراکزی که از این تکنیک استفاده مینمایند حاکی از وجود برخی از موارد منفی کاذب میباشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی مقایسه ای بین روشهای خالص سازی رایج میباشد تا ضمن آگاهی از میزان کارایی هر یک بهترین روش شناسایی گردد.

از ۳۰ نمونه دریافتی از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه هپاتیت بیمارستان شریعتی تهران که مبتلا به هپاتیت مزمن بوده و HBs آنتی ژن مثبت و HBe آنتی ژن منفی بودند نمونه سرم تهیه گردید. استخراج HBV DNA با سه روش توسعه یافته جوشاندن بعنوان یک روش سریع، روش فنل کلروفرم بعنوان یک روش دقیق، و روش خالص سازی مبتنی بر گوانیدیوم هیدروکلراید انجام گردید. کیتPCR برای تشخیص هپاتیت از شرکت سیناژن استفاده گردید که شامل آنزیم taq پلیمراز و مخلوط واکنشی متشکل از پرایمرdNTP و بافر واکنش بود. پروتکل PCR مزبور قادر به تکثیر محصولی به طول ۳۵۳ bp بود. سپس با چرخه گرمایی مناسب نمونه ها با واکنش PCR تکثیر گردید و محصول PCR در سه روش مقایسه شد.

نتایج بدست آمده در مرحلهٔ اول موید موفقیت پروتکل استفاده شده در تشخیصDNA هپاتیت B در سرم بود. همچنین میزان موارد مثبت روش جوشاندن ، روش فنل کلروفرم و کیت خالص سازی به ترتیب ۱۹،۱۶ و ۲۳ و موارد منفی به ترتیب ۱٤، ۱۱ و ۷ مورد بود.

روش PCR سریعترین و دقیق ترین روش جهت شناسایی بیماران بوده و روش تخلیص DNA توسط گوانیدیوم هیدروکلراید در ویروس ها موفقیت آمیز ترین روش بکار رفته در این بررسی است.

**کلید واژه ها :** اسید نوکلئیک / واکنش زنجیره پلیمراز / هپاتیت B

**مقدمه :**

هپاتیت B نهمین بیماری شایع عفونی در دنیا میباشد. بر طبق گزارش WHO پنج درصد تمام مردم دنیا دارای آنتی ژن HBs هستند که این تعداد در سال ۲۰۰۰ به ۴۰۰ میلیون نفر رسید. در ایران آلودگی به ویروس هپاتیت B شایعترین علت بیماریهای کبدی بوده و میزان آلودگی بین ۲/۵ تا ۳/۶ درصد گزارش شده است(۱). شاخص سرولوژیک دیگر عفونت HBV که به آسانی قابل

* استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** کارشناس ارشد بیوشیمی
**** کارشناس مسئول اطلاع رسانی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

شناسایی است $HB_eAg$ می باشد که همزمان با $HB_SAg$ یا کمی بعد از آن ظاهر می شود. پیدایش آن بطور موقت همزمان با درجات بالای همانندسازی ویروس است و بیانگر وجود ویریونهای دست نخورده و یا HBV DNA در گردش خون است. در عفونت های HBV که خودبخود بهبود می یابند $HB_eAg$ اندکی بعد از به اوج رسیدن آمینوترانسفرازها و قبل از ناپدید شدن $HB_SAg$ غیر قابل شناسایی می شود و پیش از افزایش Anti $HB_e$ همزمان با دوره ای از کاهش نسبی عفونت زایی قابل اندازه گیری می‌شود(۴-۲). بررسیهای سرولوژیک پروتئینهای ویروسی نمی تواند یک شاخص قابل اعتماد برای مقدار HBV DNA باشد به دلیل اینکه ممکنست ذرات ویروسی کمی وجود داشته باشد و یا اصلاً نباشد یا ممکنست مقدار زیادی از ذرات تحت ویروسی که فاقد DNA ویروسی هستند در سرم بیمار وجود داشته باشد(۵،۱).

روش PCR اخیراً در تشخیص و پیگیری بیماریهای عفونی از اهمیت ویژه ای برخوردار گردیده است. روش حساس تعیین مقدار DNA ویروس به وسیله PCR می تواند معرف میزان تکثیر ویروس ، میزان عفونت زایی و تغییرات مقدار DNA ویروس در طی زمان عفونت یا در طی مطالعه سیکل زندگی ویروس باشد(۶).

سرعت یکی از عواملی است که نقش تعیین کننده دارد لذا باید زمان لازم برای تشخیص در مراحل سه گانه آماده نمودن نمونه ، تکثیر (Amplification) و تعیین محصول موردتوجه قرار گفته و حتی المقدور کاهش یابد ، به گونه ای که از زمان دریافت نمونه تا اعلام نتیجه با مدت لازم برای انجام اکثر تستهای سرولوژیکی قابل مقایسه باشد. کاهش زمان تکثیر با طرح Rapid PCR با بکارگیری از لوله های موئین و ترموسیکلر خاص (۷) و همچنین با استفاده از ترموسیکلرهای معمولی پیشنهاد شده است. ضروری است ، شیوه هایی که جهت خالص سازی DNA مورد استفاده قرار می گیرد علاوه بر برخورداری از حداقل زمان و سرعت بالا ، روش مطمئنی جهت حذف ممانعت کننده ها (Inhibitors) و خالص نمودن کلیه اسیدهای نوکلئیک نیز باشد. این ممانعت کننده ها گوناگون بوده و می توانند در ارتباط با نوع نمونه بالینی متفاوت باشند (۸).

در نمونه هایی که حاوی مقادیر اندکی از اورگانیسم باشند ، روش خالص سازی تأثیر بسزایی در حساسیت تست خواهد داشت. در صورتیکه خالص نمودن DNA در نمونه بالینی از کیفیت پایینی برخوردار باشد ، بواسطه اثر مهارکنندگی مواد موجود در نمونه و یا استفاده شده در مراحل خالص سازی بر فعالیت پلیمراز نتیجه تست منفی کاذب خواهد گردید.

با توجه به مناسب بودن کیت PCR مورد استفاده در این مطالعه در تشخیص هپاتیت B معهذا باید توجه داشت علاوه بر مناسب بودن پرایمرها عوامل متعدد دیگری نیز می توانند در میزان حساسیت کیت تأثیر گذار باشند . یکی از مهمترین این عوامل اینست که قابلیت بازیافت DNA در روش های متفاوت خالص سازی یکسان نمی باشد. منفی شدن برخی از نمونه ها در روش جوشاندن حکایت از این دارد که این روش از حساسیت کافی برای بازیافت تمامی DNA هدف موجود در نمونه برخوردار نمی باشد و می بایست از روشهای حساس تر دیگری استفاده نمود که به آن اشاره شده است.

باتوجه به‌آنکه برای ارزیابی طرق متفاوت خالص سازی DNA باید با نمونه های کلینیکی اقدام نمود ضروریست در بررسی حاضر روشهای خالص سازی بکار گرفته شده (فنل ، کلروفروم، جوشاندن و استخراج با درجه خلوص بالا با استفاده از ترکیب گوانیدیم هیدروکلراید) با نمونه های کلینیکی HBV مثبت مورد آزمایش و مقایسه قرار گیرد.

## روش کار:

**نمونه های کلینیکی:** تعداد ۳۰ نمونه سرم از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه هپاتیت بیمارستان دکتر شریعتی تهران که مبتلا به هپاتیت مزمن بوده از نظر آنتی ژن HBs مثبت و آنتی ژن HBe منفی بودند تهیه گردید. به منظور استخراج HBV DNA با سه روش مورد نظر هر نمونه پس از تهیه به سه قسمت مساوی تقسیم گردید. نمونه برداری از بیماران و تخلیص DNA در آزمایشگاه مرکز تحقیقات گوارش بیمارستان شریعتی انجام گرفت و سایر مراحل مورد نیاز شامل آماده سازی مخلوط واکنش و امپلیفیکاسیون و الکتروفورز در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده پزشکی همدان انجام شد.

**الف) استخراج DNA ویروس با روش جوشاندن:** به منظور کاستن اثرات منفی حرارت جوش بر DNA به نحو زیر عمل گردید. ابتدا مقدار ۱۰۰µl از هر نمونه سرم در میکروتیوپ به مدت ۵ دقیقه در ماکرو ویو تحت حرارت قرار گرفت. سپس به هر میکروتیوپ ۱۰ µl آب ۲ بار تقطیر

استریل اضافه گردید و میکروتیوپ‌ها را کاملاً ورتکس نموده و در دمای ۶۹°C به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم. پس از آن میکروتیوپ‌ها را مجدداً ورتکس نموده و به مدت ۱ دقیقه در ۷۵۰۰g سانتریفوژ نمودیم تا در حجم ۳۰ µl بافر شناور شد(۹).

**ب) استخراج DNA ویروس با روش فنل ـ کلروفرم:** برای استخراج DNA در این روش از محلول DXP™ سیناژن که حاوی پروتئیناز K و سدیم دودسیل سولفات می‌باشد به نحو زیر استفاده شد. در یک میکروتیوپ ۱۰۰ µl سرم را به ۸µl محلول DXP™ اضافه نموده کاملاً آن را ورتکس کرده و ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰°C قرار دادیم سپس در دمای ۴°C برای مدت ۵ دقیقه سرد نمودیم. در مرحله بعد به هر میکروتیوپ ۱۰۰ µl فنل/کلروفرم اضافه و ورتکس نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ کردیم. فاز آبی را به یک میکروتیوپ جدید منتقل نموده و هم حجم آن کلروفرم/ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه کرده، پس از ورتکس و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ کردیم. مجددا فاز بالایی را به یک میکروتیوپ جدید منتقل نموده و ۱/۱۰ حجم آن سدیم استات ۳ مولار (موجود بر روی یخ) و سه حجم اتانل ۹۶٪ اضافه نموده، مخلوط مذکور برای مدت ۳۰ دقیقه به روی یخ نگهداری نمودیم. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰gبه ته نشین ۵۰۰µl اتانل ۷۰٪ اضافه نموده و ۵ مرتبه وارونه کردیم. میکروتیوپ را به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ، سپس دکانته نموده و ته نشین را تحت خلاء به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم یا ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C خشک نمودیم. مقدار ۳۰µl آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده به نمونه اضافه نموده و در دمای ۲۰°C- نگهداری کردیم(۱۰،۱۱).

**ج) استخراج DNA ویروس با استفاده از High Pure Nucleic Acid Kit:** بافرهای کیت تهیه شده از شرکت سیناژن حاوی گوانیدیوم هیدروکلراید می‌باشد. در ابتدا به ۲۰۰µl سرم، ۲۰۰µl محلول کار که حاوی بافر بایندینگ می‌باشد و ۵۰µl پروتئیناز K اضافه نموده به سرعت مخلوط کرده و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C قرار دادیم. در مرحلهٔ بعد لوله‌های فیلتردار موجود در کیت را در لوله‌های جمع‌کننده که آنها نیز در کیت موجود می‌باشد قرار دادیم و نمونه‌های سرم را در داخل لولهٔ بالایی (فیلتردار) اضافه نموده و برای ۱ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفوژ نمودیم. لوله‌های جمع کننده را دور ریخته و لوله‌های فیلتردار که اسیدهای نوکلئیک به فیبرهای شیشه‌ای آن متصل شده بود را به لوله‌های جمع کننده جدید منتقل نموده و به هر کدام ۵۰۰µl بافر خارج کننده ترکیبات مهار کننده (Inhibitor Removal Buffer) اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفوژ نمودیم. ته نشین را دوبار توسط ۴۵۰µl بافر شستشو نمودیم و به منظور اطمینان از خروج تمام بافر از فیلتر در ۱۳۰۰۰g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم، لوله‌های جمع‌کننده را دور ریخته و لوله‌های فیلتردار را به میکروتیوپ‌های ۱/۵ml تمیز و عاری از نوکلئاز منتقل نموده و به هر کدام ۵۰µl بافر Elution به لوله‌های فیلتردار اضافه نموده و برای یک دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفوژ نموده اسیدهای نوکلئیک به میکروتیوپ منتقل کرده و در حجم ۶۰ µl شناور نمودیم که در دمای ۲۸°C- قابل نگهداری بود(۱۲).

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز HBV:** برای انجام واکنش PCR از کیت تشخیص PCR ویروس هپاتیت B شرکت سیناژن استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این کیت جهت تشخیص DNA ویروس هپاتیت B بوسیلهٔ روش PCR در سرم و پلاسمای خون انسان و دیگر نمونه‌های انسانی طراحی گردیده است که قادر به تولید محصولی به طول ۳۵۳ bp میباشد. این کیت می‌تواند جهت تشخیص HBV DNA در نمونه‌های کلینیکی و ارزیابی بازده درمان به کار رود. محتویات کیت در جدول زیر ذکر گردیده است.

**مواد تشکیل دهنده کیت PCR برای تشخیص هپاتیت**

| مقادیر | مواد تشکیل دهنده |
|---|---|
| 1 cc | 1 x PCR MIX (dNTP ، $MgCl_2$شامل پرایمرها) |
| 2.5µl (SU/UL) | Tag DNA Polymerase |
| 1 ml | Mineral Oil |
| 50 µl | Positive Control |
| 0.5ml | DNX ™ (مخلوط پروتئیناز K و SDS) |

پس از آماده نمودن لوله های آزمایش و اضافه نمودن نمونه جهت انجام PCR با استفاده از یک ترموسیکلر مدل اپندورف آلمان بر طبق برنامه جدول ارائه شده عمل شد و در انتها پس از تکثیر ، نمونه ها در آگارز ۲٪ حاوی ۰/۵mg/ml اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و در مجاورت ladder 100 br توسط ترانس ایلومیناتور بررسی گردیدند(۹،۱۱).

**برنامه آمپلیفیکاسیون برای تکثیر در ۳۶ سیکل**

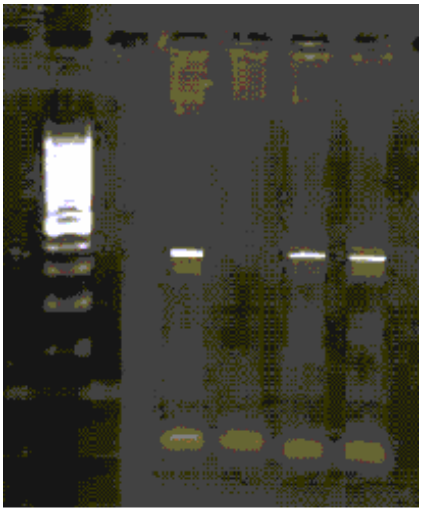
| مرحله | درجه حرارت (سانتیگراد) | زمان (ثانیه) |
|---|---|---|
| جداسازی | ۹۳ | ۲۰(در سیکل اول ۶۰ ثانیه) |
| اتصال | ۶۱ | ۲۰ |
| پلیمریزه نمودن | ۷۲ | ۴۰ |

مخلوط واکنش در حجم ۲۵µl برای سه روش بصورت زیر آماده گردید

PCR Mix ۱۵µl ، DNA ۱ µl خالص شده ، DDW ۹ µl و Tag ۰/۴ µl پلیمراز

## نتایج :

**آزمایش کارایی سیستم:** کیت تهیه شده ابتدا با کنترل مثبت مورد آزمایش قرار گرفت ونتیجه انجام PCR موید تکثیر محول مورد نظر مطابق با bp ۳۵۳ را داشت (تصویر ۱).




**تصویر ۱: با استفاده از *100bp Ladder و بررسی نمونه ها همانگونه که در شکل مشخص است نمونه های ۲و۴و۵ دارای باند bp ۳۵۳ می باشد.**

* شرکت Fermentas

**نتایج حاصل از آزمایش نمونه ها با روشهای سه گانه خالص سازی:** نمونه های سرم جمع آوری شده مطابق روش اتخاذ شده با هر روش برای خالص سازی DNA مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ارزیابی کارایی هر روش DNA خالص شده با پرایمر های موجود در کیت تشخیصی PCR مورد آزمایش قرار گرفت. تعداد موارد مثبت در روش ، جوشاندن ، فنل- کلروفرم و گوانیدیوم هیدروکلراید به ترتیب ۱۹،۱۶ و ۲۳ و موارد منفی نیز به ترتیب ۱۴، ۱۱ و ۷ مورد بود(جدول ۱).

**جدول ۱ : نتایج سه روش استخراج HBV DNA برروی ۳۰ نمونه سرم براساس آزمون کوکران (Cochran)**

| روش‌های استخراج | مثبت | منفی | جمع کل | Asymp (Sig) |
|---|---|---|---|---|
| | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) | تعداد (درصد) | P-value = ۰/۰۰۴ Significant |
| $PCR_3$* | ۲۳ (۷۶/۷) | ۷ (۲۳/۳) | ۳۰ (۱۰۰) | |
| $PCR_2$** | ۱۹ (۶۳/۳) | ۱۱ (۳۶/۷) | ۳۰ (۱۰۰) | |
| $PCR_1$*** | ۱۶ (۵۳/۳) | ۱۴ (۴۶/۷) | ۳۰ (۱۰۰) | |

* $PCR_3$ نتایج حاصل از روش گوانیدیوم هیدروکلراید

** $PCR_2$ نتایج حاصل از روش فنل ـ کلروفرم

*** $PCR_1$ نتایج حاصل از روش جوشاندن

## بحث:

نتایج حاصل از آزمایشPCR با سه روش خالص سازی مشخص نمود که روش خالص سازی مبتنی بر استفاده از گوانیدیوم هیدروکلراید در نمونه های بررسی شده موفقتر از دو روش دیگر بود روش جوشاندن دارای معایب و محاسن متعددی است. این روش اصولا دارای مرحله ای تحت عنوان خالص سازی نمیباشد، بلکه توانایی آن تنها از این نظر مهم میباشد که میتواند DNA را در دسترس قرار دهد. علاوه بر این مواد مصرفی در این روش کمتر بوده و در زمان کوتاه امکان کار با نمونه های انبوه وجود داشته و آلودگی در آزمایشگاه نیز کمتر خواهدبود. از معایب این روش هم عدم حذف کامل مهار کننده ها می باشد و دیگر اینکه روش جوشاندن قادر به استفاده نمونه های با مقادیر کم HBV DNA نمی باشد. با وجود معایب متعدد آن بواسطه سرعت مطلوب این روش، در بسیاری از آزمایشگاه ها تشخیص طبی که از PCR استفاده میگردد برای آماده نمودن DNA از آن استفاده می نمایند.

در روش فنل کلروفرم که عموما بعنوان یک روش تحقیقاتی شناخته میگردد، میزان DNA بدست آمده نسبت به روش جوشاندن بیشتر خواهد بود و در مقایسه با آن از قدرت تخلیص بالاتری برخوردار میباشد. از معایب این روش اینست که روش فنل کلروفرم تقریبا"

پیچیده و وقت گیر بوده و علاوه بر اینکه به وسایل یکبار مصرف بیشتری نیاز است امکان آلودگی در ضمن کار در این روش نیز بیشتر میباشد. همچنین مقدار کم فنل باقی مانده در محلول خالص شده میتواند اثر مهار کننده داشته باشد (۱۱،۱۳). جداسازی اسیدهای نوکلئیک ویروس توسط کیت خالص سازی مورد استفاده که مبتنی بر استفاده از گوانیدیوم هیدروکلراید بود در مقایسه با روش فنل-کلروفرم از سرعت بمراتب بالاتری برخوردار میباشد. در این روش با استفاده از مواد نظیر پروتئیناز K و گوانیدیوم هیدروکلراید DNA جدا شده، سپس توسط بافر اختصاصی مهارکننده ها نیز خارج میگردند. در مجموع در این روش بواسطه آنکه وسایل کمتری استفاده میشود، احتمال آلودگی نیز کاهش می یابد. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر مشخص نمود که در عمل علاوه بر سرعت مطلوب این روش در میزان بازیافت DNA ویروس هم از دو روش دیگر موفق تر بوده است. استفاده از بافر های حاوی گوانیدیوم نیز قبلا مکرر بصورت موفقیت آمیز در ویروس ها گزارش شده است(۱۴). حتی در ارتباط با باکتری ها نیز گزارش شده که بافر لیز کننده حاوی تیوسیانات رضایت بخش بوده است(۱۳،۱۵).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که روش گوانیدیوم هیدروکلراید در نمونه های مورد استفاده حساس ترین روش خالص سازی می باشد ضمناً بواسطه جابجایی کمتر محلول ها در پروسه خالص سازی احتمال آلودگی نیز کمتر خواهد بود.

**سپاسگزاری :**

بدینوسیله از زحمات استادان ارجمند جناب آقای دکتر ملک زاده و مهندس مانی کاشانی و همچنین از پرسنل آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی و درمانگاه هپاتیت بیمارستان دکتر شریعتی تهران که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده اند تشکر میگردد.

**منابع :**

1. Ismail S. Infectious disease in Iran, Viral disease section. 3rd ed. Tehran: Alborz, 1993.
2. Chan HL, Ghany MG, Lok A. Hepatitis B. In : Schiff ER (ed). Disease of the Liver. New York : Lippincott Raven , 1999 : 757-791.
3. Decker RH. Diagnosis of acute and chronic hepatitis B. In: Zacherman AJ, (ed). Viral Hepatitis. New York : Churchill –Livingstone , 1998 : 201-215.
4. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute viral hepatitis In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, (ed). Harrison's principles of Internal Medicine. 14th ed. New York: Mc Graw Hill, 1998.
5. Sherlock S. Clinical features of hepatits. in: Zacherman AJ, (ed). Viral Hepatitis. New York: Churchill-Livingstone , 1998.
6. Kramvis A, Bukofzer S, Kew MC. Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIA amp blood kit, Gene Releaser, and the phenol-chloroform method. J Clin Microbiol 1996; 34(11): 2731-3
7. Wittwer CT , Reed GB , Ririe KM. Rapid cycle DNA amplification . Mullis KB , Ferr F , Gibbs RA , (eds). The polymerase chain reaction . Boston : Brikhauser , 1994 : 174-180.
8. Higuchi R. Rapid efficient extraction for PCR from cells or blood. PCR methods and applications , 1989 ; 1 : 46-50.
9. Sambook J., Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning Vol. 1. 1-3, New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 1989.
10. Reischi V. Methods in molecular medicine. Molecular biology based methods in clinical diagnosis. Totowa NJ : Humane , 1997.
۱۱. شاه‌حسینی محمدحسن. واکنش زنجیره پلیمراز. تهران : پارسیوان، ۱۳۸۰.
12. Sommer G, Will H. Genotype specific analysis of hepatitis B virus DNA on the lightcycler. In : Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds). Rapid cycle real-time PCR. Philadelphia: Springer , 2000 : 303-311.
۱۳. حاجیا مسعود. ارزیابی روش یک مرحله ای خالص سازیDNA ، نمونه های بالینی. مجله پزشکی ارومیه، سال دهم ، شماره ۲، ۱۳۷۸ : ۱۰۱-۹۳.
14. Cases I. New method for the extraction of viral RNA and DNA. J Virol Methods 1995 ; 53: 25-36.
۱۵. حاجیا مسعود. ارزیابی پارامترهای موثر بر PCR مایکوپلاسما. یازدهمین همایش بین المللی کنگره پزشکی جغرافیایی . شیراز ، ۱۳۷۷ : ۲۵۱