

MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİNDE YAŞANAN SORUNLAR

Doç Dr Cengiz ÇAVUŞOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AB Dalı Bornova,
İzmir

Son on yıl içinde mikobakterilerin hastalık örneklerinden saptanması, kültürde üreyen mikobakterilerin tanımlanması ve antitüberküloz ilaç direncinin saptanması için çok sayıda nükleik asit temelli test kullanıma sunuldu (23). Bu yöntemler rutin uygulamada sağladıkları kolaylıkların ve yararların yanı sıra birtakım sorunları da beraberinde getirmiştir. Sunulan derlemede klinik örneklerden mikobakterilerin saptanmasında, kültürde üreyen mikobakterilerin tanımlanmasında ve ilaç direncinin belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemlerin rutin uygulamaları ve uygulamada karşılaşılan sorunlar gözden geçirilmiştir.

Kullanımdaki Ticari Direkt Amplifikasyon Testleri

Klinik örneklerden mikobakterilerin saptanmasında başta polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) olmak üzere strand displacement amplification (SDA) ve ligaz zincir reaksiyonu (LCR) gibi çeşitli amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (23). Amplicor M.tuberculosis testi (Roche Molecular System, Branchburg, NJ) tüm mikobakteri türlerinde ortak olarak bulunan 16S rRNA geninin (16S rDNA) 584 bp'lik bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve oluşan DNA amplikonlarının M.tuberculosis kompleks'e özgü proplarla kolorometrik yöntemle saptanması temeline dayanır. Yöntemin otomatize şekli Cobas Amplicor MTB olarak adlandırılmaktadır. Testte internal amplifikasyon kontrolü bulunmakta ve test 6 saat içinde sonuçlanmaktadır. Amplicor direkt bakısı pozitif solunum örneklerinde tanısal amaçla kullanılması için FDA onayı almıştır (23). Amplified M.tuberculosis Direct (AMTD2) testi (Gen-Probe, Inc., San Diego, Calif.) 16S rRNA'nın 420C'de izotermal olarak TMA ile çoğaltılması ve oluşan RNA amplikonlarının M.tuberculosis kompleks'e özgü acridinium esterle işaretlenmiş DNA propları ile kemilüminisens yöntemle saptanması temeline dayanır. AMTD2-2.5 saat içinde sonuçlanmakta ve testte internal amplifikasyon kontrolü bulunmamaktadır. Yöntemin tüm solunum

örneklerinde tanısal amaçla kullanılması FDA tarafından onaylanmıştır (23). BD ProbeTec energy transfer (ET) Direct TB System (DTB) testi (Becton Dickenson Biosciences Microbiology Products, Sparks, Md.) M.tuberculosis kompleks'e özgü IS6110 ve mikobakteri türleri için ortak 16S rDNA bölgesinin 52.50C'de izotermal olarak SDA yöntemi ile çoğaltılması ve oluşan DNA amplikonlarının M.tuberculosis kompleks'e özgü floresan boya ile işaretlenmiş DNA propları ile florimetrik yöntemle saptanması temeline dayanır. DTB'de internal amplifikasyon kontrolü bulunmakta ve test 6 saat içinde sonuçlanmaktadır. DTB tanısal amaçla kullanılması için henüz FDA onayı almamıştır. LCx MTB testi (Abbott Laboratories, Abbott Park., Ill) LCR ile probe amplifikasyonu temeline dayanan bir yöntemdir. LCx MTB FDA tarafından onaylanmamış ve 2002 yılından sonra Avrupa'da da kullanımdan çekilmiştir (23).

Klinik Uygulamadaki Deneyimler

Ticari direkt amplifikasyon testlerinin klinik performansları hakkında elimizde yeterli veri bulunmasına karşın veri toplanması ve analizindeki farklı yan tutmalardan dolayı çalışmaların karşılaştırılmasında güçlükler yaşanmaktadır. Ayrıca, kültürün tüberküloz tanısında altın standart olarak kabul edildiği durumlarda basil çıkarmayan, kültür negatif olgular altın standartta bir duyarlılık sorunu yaratmaktadır. Bu durum duyarlılığı daha yüksek ancak kontaminasyona bağlı olarak yanlış pozitiflik riski de bulunan bir yöntemi altın standartla karşılaştırırken sıkıntı yaratmaktadır (16, 23).

Direkt bakı/kültür pozitif solunum örneklerinde Amplicor, AMTD2 ve DTB'nin duyarlılığı genellikle %95'in üzerindedir (8, 9, 16, 23). Direkt bakısı negatif solunum örneklerinde ise Amplicor'un duyarlılığı %50-71.7, AMTD2'nin %75-83, DTB'in ise %33-100 arasında değişmektedir (2, 3, 13, 22, 23, 25). Direkt bakı/kültür pozitif ekstrapulmoner örneklerde Amplicor'un duyarlılığı %87.5-100 arasında değişirken direkt bakı/kültür negatif örneklerde bu oran %17.2-70.8 olarak bulunmuştur (23). Solunum dışı örneklerde inhibitör maddelerin daha sık olması nedeniyle özellikle plevral sıvı, gastrik aspiratlar, lenf düğümü ve BOS'da Amplicor'la yetersiz sonuçlar alınmaktadır (23). Testin kültürle karşılaştırıldığı çalışmalarda antitüberküloz tedavi alan hastalarda ve tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonu

olan hastalarda yanlış pozitif sonuçlar bildirilmiştir (4, 14, 25, 26, 28). İnternal amplifikasyon kontrolünün bulunması Cobas Amplicor'un en önemli avantajıdır (23).

Direkt bakı/kültür pozitif ekstrapulmoner örneklerde AMTD2'nin duyarlılığı %92.3-100 arasında değişirken direkt bakı/kültür negatif örneklerde %63.6-88.9 olarak bulunmuştur (1, 13, 22). AMTD2'de 30.000 RLU olan eşik değeri ile nisbeten sık yanlış pozitiflikler saptanması nedeniyle bu değer kitin üreticisi tarafından değiştirildi ve sonucu 30.000-500.000 RLU arasındaki çıkan örneklerde testin tekrarlanması önerildi. Son yapılan çalışmalarda optimal eşik değeri 300.000 RLU olarak alındığında duyarlılıkta düşme olmadan özgüllükte düzelme sağlandığı bildirilmiştir (17, 21). Testin kültürle karşılaştırıldığı çalışmalarda tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonu olan hastalarda yanlış pozitif sonuçlar bildirilmiştir (1, 22, 24, 27). İnhibitörleri saptayan internal amplifikasyon kontrolünün bulunmaması AMTD2'nin en önemli dezavantajıdır (23).

Direkt bakı/kültür pozitif ekstrapulmoner örneklerde DTB'nin duyarlılığı %90-98.5 arasında değişirken direkt bakı/kültür negatif örneklerde bu oran %40.3-85.7 olarak bulunmuştur (15, 19, 20). İnternal amplifikasyon kontrolünün bulunması, sistemin amplikon kontaminasyonunu en aza indirecek şekilde tasarlanmış olması, örnek işlenmesi ve amplifikasyonun aynı ortamda gerçekleştirilebilmesi ve testte kullanılan tüm reagenlerin oda ısısında saklanabilmesi testin avantajıdır. DTB ile tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonu olan hastalarda yanlış pozitif sonuç bildirilmemiştir. Örnek hazırlama işlemlerinin emek yoğun olması sistemin en önemli eksikliğidir. (23).

Yanlış Pozitif Sonuçlar

Halen kullanımda olan ticari direkt amplifikasyon testleri canlı ve cansız mikroorganizmayı ayıramamaktadır. Tedaviye iyi yanıt verip klinik düzelme sağlanan hastalarda bile tedavi sırasında ve tedavi bitiminden sonra bu testlerle pozitif sonuçlar alınabilmektedir (9, 23). Yanlış pozitifliğin bir diğer nedeni de tanıda altın standart olarak klinik kanıtların yerine kültür pozitifliğinin kabul edilmesidir. Direkt bakının negatif olduğu az miktarda basil çıkarılan durumlarda

basilin örnek içinde dengesiz dağılımına bağlı olarak kültürde üreme olmadığı halde ticari direkt amplifikasyon testleri pozitif olarak saptanabilmektedir. Bu nedenle tek başına kültür sonuçlarıyla ticari direkt amplifikasyon testlerinin performansını değerlendirmek çok doğru değildir. Kültür sonuçlarının klinik bulgularla birlikte değerlendirilmesi daha doğru sonuç vermektedir. İyi eğitilmiş personel, uygun ekipman ve yeterli fiziki koşullar amplikon kontaminasyonuna bağlı gerçek yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak için önemlidir. Ayrıca yanlış pozitif sonuçları önlemek için çalışma ortamı %10 çamaşır suyu ile dezenfekte edilmeli, amplikon kontaminasyonunun kontrolü için belli aralıklarla çalışma ortamından alınan örnekler test edilmelidir (23).

Yanlış Negatif Sonuçlar

Kullanımdaki ticari direkt amplifikasyon testleriyle aktif tüberküloz hastalarından elde edilen klinik örneklerde yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir. Bu örneklerin çoğu direkt bakısında basil saptanamayan örneklerdir. Bu durumda çok az sayıda basil örnek içinde homojen olmayan bir şekilde dağılmış olabilir ve dekontaminasyon işlemi sırasında örnek uygun bir şekilde dilüe edilmezse yanlış negatif sonuç alınabilir. Yanlış negatifliğin diğer olası nedenleri ise örnekte bulunan inhibitörler ve hedefin yetersiz ekstraksiyonudur. Bazen örneklerin içinde bulunabilen nükleaz ve proteazlar amplifikasyonu inhibe ederek yanlış negatifliğe yol açabilirler. Örneklerde %1'den %20'lere kadar artan oranlarda inhibitör madde olabildiği bildirilmektedir. Inhibitörler çoğu kez direkt bakısı negatif örneklerde görülmesine karşın direkt bakısı pozitif örneklerde de görülebilir. İnternal amplifikasyon kontrolü içeren sistemlerde bu durum saptanabilir. Inhibitörler hastanın bütün örneklerinde bulunmadığı için hastanın farklı bir örneğinin çalışılmasıyla çoğu kez bu sorun aşılabılır. Ayrıca, günümüzde hedef ekstraksiyonu için fenol-kloroform yöntemi gibi kimyasal temelli yöntemlerinin yerine ısıtma, sonikasyon gibi fiziksel temelli yöntemlerin kullanılması da hem ekstraksiyon işlemini basitleştirmiş hem de kimyasallara bağlı inhibisyon riskini ortadan kaldırmıştır (23).

Rutin Uygulamada Ticari Direkt Amplifikasyon Testleri: Temel Prensipler

Ticari direkt amplifikasyon testlerinden Amplicor ve AMTD2 klinik tanıda kullanılması için FDA onayı almıştır. Bu onay Amplicor için yalnız direkt bakısı pozitif solunum örneklerde geçerliken, AMTD2 için tüm solunum örneklerinde geçerlidir. Bununla birlikte ticari direkt amplifikasyon testleri ekstrapulmoner örneklerde de tüberküloz tanısı için kullanılmaktadır. Direkt amplifikasyon testleriyle antitüberküloz tedavi alan hastalarda yanlış pozitif sonuçlar alınabilir. Bu nedenle bu testler 7 günden uzun süreyle antitüberküloz ilaç kullanan hastalarda ve antitüberküloz tedavi bitiminden sonraki 2 ay içinde uygulanmamalıdır (23).

Hastadan alınan her üç balgam örneğinin direkt bakısının negatif olduğu durumlarda direkt amplifikasyon testleri ilk toplanan örnekte uygulanmalı, yoksa direkt bakısı pozitif örnekte uygulanmalıdır. Direkt bakısı ve direkt amplifikasyon testinin pozitif saptandığı durumda tüberküloz tanısı doğrulanır. Direkt bakısı pozitif bir örnekte direkt amplifikasyon testi negatif ise inhibitör varlığı açısından test ikinci kez hastanın direkt bakısı pozitif farklı bir örneği ile tekrarlanır. Test sonucu yine negatif çıkarsa tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonu olasılığı düşünülür. Direkt bakısı negatif örnekte direkt amplifikasyon testi pozitif saptanırsa test tekrarlanır; ikinci kez pozitif çıkarsa tüberküloz düşünülür. İki ardışık örnekte hem direkt bakı hem de direkt amplifikasyon testi negatif olarak saptanırsa hastanın tüberküloz olmadığı düşünülür (5, 23). Bununla birlikte kesin tanı klinik bulgularla birlikte değerlendirilerek verilmelidir. Ticari direkt amplifikasyon testlerinin tüberküloz olma olasılığı çok yüksek olan hastalarda veya tüberkülozun çok düşük olasılık olduğu hastalarda kullanılması sağlık kaynaklarının uygunusuz kullanımına yol açmaktadır. Bu yöntemler temel olarak diğer bulgularla birlikte hastanın tanısı değerlendirilmesini ve tedavisini etkileyebilecek, tüberkülozun ne çok yüksek ne de çok düşük bir olasılık olduğu direkt bakısı negatif ancak klinisyen tarafından tüberküloz kuşkulu olarak değerlendirilen hastalarda kullanılmalıdır (23).

Günümüzde kabul gören görüşe göre moleküler testler sadece Amerikan Toraks Cemiyeti'nin seviye II ve III standartlarını yakalamış, konvansiyonel

yöntemlerin kullanılmasında yüksek standartları yakalamış labortuvarlar tarafından uygulanmalıdır. Hasta izleminde moleküler testleri haftada bir kez çalışmanın suboptimal olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu yöntemler haftada iki, üç kez olacak şekilde çalışılmalıdır (23).

Sonuç olarak yanlış negatiflik, yanlış pozitiflik, direkt bakısı negatif örneklerde ve ekstrapulmoner örneklerde göreceli olarak düşük duyarlılık ve tüberküloz dışı mikobakterilerin saptanamaması ticari direkt amplifikasyon testlerinin temel sorunlarıdır. Direkt bakısı negatif olgularda pozitif sonuçlar bildirilirken dikkatli olunmalı ve kuşkulu durumlarda test tekrarlanmalıdır. Klinisyen böyle olgularda testin sonucunu kanıtlardan biri gibi düşünülmelidir. Ayrıca, bu yöntemler uygun kalite güvencesi altında kullanılmalıdır.

Kültürde Üreyen Mikobakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Testler

Hızlı veya konvansiyonel yöntemlerle üretilen mikobakterilerin tanımlanması mikobakteriyel enfeksiyonların tanısında önemli bir aşamadır. Biyokimyasal yöntemler zaman alıcı ve zahmetlidir. Bu nedenle kültürde üreyen mikobakterilerin tanımlanmasında moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Tür tanımlamasında 16S-23S rRNA ITS gen bölgesini hedef alan ve insanlarda hastalık etkeni mikobakteri türlerinin önemli bir bölümünü saptayabilen INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics NV, Zwijndrecht, Belgium) gibi reverz hibridizasyon testleri rutin uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (12). Manuel ve otomatize olarak uygulanabilen reverz hibridizasyon testleri moleküler yöntemler için asgari koşulların bulunduğu laboratuvarlarda sorunsuz olarak kullanılabilir. Bu yöntemlerle günler, haftalar süren tanımlama işlemleri 6 saat içinde tamamlanabilmektedir. Bu testler çok sayıda klinik çalışmada değerlendirilmiş hızlı, duyarlı ve özgül bulunmuştur (12).

DNA dizi analizi mikobakteri türlerinin tanımlanmasında altın standart haline gelmektedir. Tür tanımlaması için genellikle hsp65 geni, 16S rRNA geni ve 16S-23S rRNA ITS bölgesini hedef alan dizi analizleri kullanılmaktadır. Dizi analiziyle bilinen türlerin yanı sıra yeni tür ya da alt türlerin tanımlanması da mümkündür. Genel kullanıma açık veri tabanlarında mikobakteri türlerine ait DNA dizi havuzu

her geçen genişlemekte bunun sonucunda elde edilen dizilerin daha sağlıklı değerlendirilmesi mümkün olmaktadır.

İlaç Direncinin Saptanmasında Kullanılan Testler

Son on yıl içinde M.tuberculosis'in ilaç direncinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasından sonra hızlı ilaç direnci saptamaya yönelik moleküler uygulamalar geliştirilmiştir. Özellikle rifampisin (RIF) ve izoniyazid (INH) direncini saptayan yöntemler klinik tanı laboratuvarlarında giderek artan oranlarda kullanılmaktadır. RIF direncinin tamamına yakınından rpoB geninin 81 bç'lik bölümündeki mutasyonlar sorumludur. Dahası rpoB genindeki belli mutasyonlarla rifabutin direnci arasında da kuvvetli bir birliktelik bulunmaktadır. Ayrıca bu kökenlerin yaklaşık %90'ında RIF direnciyle birlikte INH direnci de saptanmaktadır. Bu nedenle RIF direnci aynı zamanda INH direncini de göstermektedir (10, 11). INH'a dirençli kökenlerde farklı gen bölgelerinde mutasyonlar saptanabilmesine karşın, direncin yaklaşık %90'ından katG ve inhA bölgesindeki mutasyonlar sorumludur. INH'a dirençli kökenlerde yapılan çeşitli çalışmalarda INH direncinin %34.6-62.2'sinden katG bölgesindeki mutasyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir (18). Çavuşoğlu ve ark.(7) tarafından Ege Bölgesi izolatlarında yapılan çalışmada bu oran yaklaşık %70 olarak bulunmuştur.

Direnç saptamada INNO-LiPA RIF TB. (Innogenetics NV, Zwijndrecht, Belgium) ve GenoType MTBDR (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) gibi reverz hibridizasyon testleri ve DNA dizi analizi rutin uygulamalarda kullanılmaktadır (7, 10). Manuel ve otomatize olarak uygulanabilen reverz hibridizasyon testleri moleküler yöntemler için asgari koşulların bulunduğu laboratuvarlarda sorunsuz olarak kullanılabilir. Bu yöntemlerle günler, haftalar süren duyarlılık testleri 6 saat içinde tamamlanabilmektedir. Bu yararlarına karşılık moleküler testler hedefledikleri gen bölgesinin dışında kalan ve dirence yol açan mutasyonları saptayamamaktadır. Ayrıca bu testlerle nadiren dirence yol açmayan sessiz (DNA dizi analiz için geçerli değil) ve nötral mutasyonlar da saptanarak yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alcala L, Ruiz-Serrano MJ, Hernangomez S, et al. Evaluation of the upgraded amplified Mycobacterium tuberculosis direct test (Gen-Probe) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 41: 51–56.
2. Bergmann JS, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbe-Tec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 2766–2768.
3. Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, et al. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20: 724–731.
4. Bonington A, Strang JIG, Klapper PE, et al. Use of Roche Amplicor Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 1251–1254.
5. Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 49: 593–594.
6. Cohen RA, Muzzafar S, Schwartz D, et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assay on sputum collected within 24 hours of hospital admission. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 156: 156–161.
7. Çavuşoğlu C, Bilgiç A. Evaluation of the GenoType MTBDR ASSAY for the rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates; Preliminary Study. *European Meeting on Molecular Diagnostics. Abstract Book*. 13-14 October, Scheviningen, the Hauge, the Netherlands. 2005; 16.
8. Çavuşoğlu C, Çiçek-Saydam C, Tuncel M, Bilgiç A. Solunum örneklerinden Mycobacterium tuberculosis kompleks'in saptanmasında TMA (Gen-Probe MTD) ile Roche Amplicor PCR'in etkinliğinin karşılaştırılması. *İnfek Derg*. 2001; 15: 21–24.
9. Çavuşoğlu C, Güneri S, Suntur M, Bilgiç A. Clinical Evaluation of the FASTPlaqueTB for the rapid diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Turk J Med Sci*. 2002; 32: 487- 492
10. Çavuşoğlu C, Hilmioğlu S, Güneri S, Bilgiç A. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from Turkey

- by DNA sequencing and Line Probe assay. *J Clin Microbiol.* 2003; 40: 4435–4438.
11. Çavuşoğlu C, Karaca-Derici Y, Bilgiç A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10: 662-665.
12. Çavuşoğlu C, Karaca-Derici Y, Yaygın YE, Bilgiç A. Nontüberküloz mikobakteri izolatlarının tanımlanması. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji kongresi. Program ve Bildiri Özeti Kitabı. 28 Haziran- 1 Temmuz 2004; 145.
13. Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, et al. Comparative evaluation of initial and new version of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 684–689.
14. Gamboa F, Manterola JM, Lonca J, et al. Comparative evaluation of two commercial assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17: 151–156.
15. Johansen IS, Thomsen VØ, Johansen A, Andersen P, Lundgren B. Evaluation of a new commercial assay for diagnosis of pulmonary and non pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21: 455–460.
16. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004; 120: 418-428.
17. Kerleguer A, Koech JL, Fabre M, et al. Use of equivocal zone in interpretation of results of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1783–1784.
18. Kim SY, Park YJ, Kim WI, et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47: 497–502.
19. Maugein J, Fourche J, Vacher S, Grimond C, Bebear C. Evaluation of the BDProbeTec TM ET DTB assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44:151–155.
20. Mazzarelli G, Rindi L, Piccoli P, et al. Evaluation of the BDProbeTec ET system for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary samples: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1779–1782.
21. Middleton AM, Cullinan P, Wilson R, Kerr JR, Chadwick MV. Interpreting the results of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *M. tuberculosis* rRNA. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 2741–2743.

22. O'Sullivan CE, Miller DR, Schneider PS, Roberts GD. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1723–1727.
23. Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5355- 5365.
24. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, et al. Performance assessment of two commercial amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4138–4142.
25. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated Cobas Amplicor MTB assay for testing respiratory and non-respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2853–2860.
26. Shah S, Miller A, Mastellone A, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by the Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction test. *Chest.* 1998; 113: 1190–1194.
27. Tjhie JHT, van Belle AF, Dessens-Kroon M, van Soolingen D. Misidentification and diagnostic delay caused by a false positive amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in an immunocompetent patient with a *Mycobacterium celatum* infection. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2311–2312.
- Tortoli E, Tronci M, Passerini Tosi C, et al. Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 33: 173–179.