

AKCİĞER VE AKCİĞER DIŞI ÖRNEKLERDE "AMPLİFİYE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DİREK TEST"İN GÜVENİLİRLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ASSESSMENT OF PERFORMANCE OF "AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT TEST" IN PULMONARY AND EXTRAPULMONARY SPECIMENS

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU¹, Nuri ÖZKÜTÜK¹, Hörü GAZİ¹, Pınar ÇELİK²

ÖZET: Tüberkülozun kontrolü için hızlı ve güvenilir tanı yöntemlerinin kullanılması önemlidir. Bu nedenle nükleik asit amplifikasyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, "Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test" in (Amplified MTD Test, Gen Probe) akciğer ve akciğer dışı örneklerdeki güvenilirliği araştırılmıştır. Eylül 2001-Mart 2005 tarihleri arasında Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda toplam 267 örnek (170 akciğer, 97 akciğer dışı örnek) bu yöntem ile çalışılmıştır. Test sonuçları altın standart yöntem olan kültür ile birlikte değerlendirildiğinde; akciğer örnekleri için amplifiye MTD (AMTD) testinin duyarlılığı %84, özgüllüğü %96, pozitif prediktif değeri (PPD) %73 ve negatif prediktif değeri (NPD) %98 olarak belirlenmiştir. AMTD testi ile pozitif, ancak kültür negatif olan hastaların sonuçları klinik veriler ile birlikte yeniden değerlendirildiğinde, bu oranlar sırasıyla %88, %100, %100 ve %98 olarak bulunmuştur. Akciğer dışı örneklerde ise AMTD testinin duyarlılığı %60, özgüllüğü %100, PPD %100 ve NPD %98 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak tüberkülozun hızlı tanısında AMTD testinin akciğer örnekleri için güvenilir olduğu ve test sonuçlarının hastaların klinik verileri ile birlikte değerlendirilmesinin güvenilirliği artıracakı düşünülmüştür. Çalışmamızda, kültür pozitif akciğer dışı örnek sayısı düşük olmakla birlikte (%5), bu örneklerde duyarlılığın akciğer örneklerine oranla daha düşük bulunması nedeniyle AMTD testinin akciğer dışı tüberküloz tanısı için dikkatle kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Nükleik asit amplifikasyon teknikleri, amplifiye *Mycobacterium tuberculosis* direk testi, tüberküloz, tanı.

ABSTRACT: Since rapid diagnosis is critical in control of tuberculosis, nucleic acid amplification techniques have been widely used. The purpose of the present study was to assess the performance of Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (Amplified MTD Test, Gen-Probe) for the diagnosis of

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa. (suheylasurucuoglu@yahoo.com)

² Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Manisa.

pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in our laboratory. A total of 267 specimens (170 pulmonary and 97 extrapulmonary) were tested in the Clinical Mycobacteriology Laboratory of Manisa (a province located in Aegean part of Turkey) University Hospital from September 2001 to March 2005. When Amplified MTD (AMTD) test results were compared to the culture results taken as the gold standard, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV, NPV) for pulmonary specimens were found to be 84%, 96%, 73%, and 98%, respectively. When AMTD test positive, culture negative discrepant results were evaluated against the clinical history of the patients, these rates were detected as; 88%, 100%, 100%, and 98%, respectively. For 97 extrapulmonary specimens, sensitivity, specificity, PPV and NPV of AMTD test were 60%, 100%, 100%, and 98%, respectively. In conclusion, the results of the AMTD assay were reliable for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis; if the results were evaluated together with the clinical status of patients, the performance of the test would be increased. However, even though the culture positive extrapulmonary specimens were sparse in our study (5%), the sensitivity of the AMTD test in extrapulmonary specimens was found less than that in pulmonary specimens. Therefore it is thought that AMTD test results should be evaluated carefully for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis.

Key words: Nucleic acid amplification techniques, amplified Mycobacterium tuberculosis direct test, tuberculosis, diagnosis.

GİRİŞ

Tüberkülozun (TB) erken tanısı, hastalığın kontrolünde ve tedavinin başarısında önemli rol oynar. TB tanısında geleneksel olarak kullanılmakta olan yöntemler, mikroskopik inceleme ve kültürdür. Ancak mikroskopik incelemenin duyarlılığı düşüktür, TB olgularının yaklaşık yarısında yayma pozitifdir¹. Mikroskopik inceleme ile TB ve TB dışı mikobakteri ayırımının yapılamaması da testin özgülüğünü olumsuz yönde etkilemektedir. TB tanısında altın standart yöntem kültür olarak kabul edilir. Ancak mikobakterilerin yavaş üreme özelliği nedeniyle, kültür sonuçlarının bildirilmesi için katı kültür sistemlerinde 6-8 hafta, otomatize sıvı kültür sistemlerinde ise 3-6 hafta gereklidir. Bu nedenle direk hasta örneğinden etkenin saptanmasına yönelik moleküler testler önem kazanmıştır. Günümüzde bu amaçla kullanılan ticari kitlerin sayısı giderek artmaktadır. Bu kitlerin kullanımı sadece akciğer örnekleri için FDA (Food and Drug Administration) onayı almışsa da, akciğer dışı tüberküloz tanısında yaşanan sorunlar nedeniyle hem akciğer hem de akciğer dışı örnekler için yaygın olarak kullanılmaktadırlar². Bu testlerin duyarlılık ve özgülüğüne ilişkin birçok çalışma yayınlanmıştır³⁻⁷. Ancak çalışılan örneklerin türü ve laboratuvar uygulamaları elde edilen sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir.

Bu araştırmanın amacı, laboratuvarımızda "Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test" in (AMTD) akciğer ve akciğer dışı örneklerdeki performansını değerlendirmektir. Testin performansına ilişkin verilerin elde edilmesi ve bu bilgilerin klinisyenler ile paylaşılması, testin kalite kontrolü ve güvenilirliği açısından önemli bilgiler kazandıracaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Klinik Örnekler: Eylül 2001-Mart 2005 tarihleri arasında Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda her biri farklı hastadan alınan toplam 267 örnek (170 akciğer, 97 akciğer dışı örnek) AMTD test ile çalışıldı. Akciğer örneklerinin 139'u balgam, 31'i bronkoalveoler lavaj sıvısı iken; akciğer dışı örneklerin 38'i idrar, 22'si plevral sıvı, 13'ü açlık mide sıvısı, 10'u beyin omurilik sıvısı (BOS), 8'i doku biyopsi örneği, 2'si periton sıvısı, 1'i perikart sıvısı ve 1'i eksüda örneği idi.

Örneklerin işlenmesi ve kültür: Akciğer örnekleri ve diğer kontamine kabul edilen örnekler NALC-NaOH yöntemi ile 15 dakika dekontamine edildi ve soğutmalı santrifüjde 3.000Xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstte toplanan sıvı, dezenfektan içeren kaba boşaltıldı ve sediment 3 ml fosfat tampon ile yeniden sulandırıldı. İşlenen örnek mikroskopik inceleme, kültür ve AMTD testi için kullanıldı. AMTD testi için örnekler çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı. Normalde steril kabul edilen örnekler dekontamine edilmeden direk olarak veya santrifüj edildikten sonra kullanıldı. Doku biyopsi örnekleri ise steril koşullarda parçalara ayrıldıktan sonra cam boncuk içeren 50 ml Falkon santrifüj tüplerine alınarak vorteksleme yolu ile homojenize edildi.

Mikroskopik incelemede Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) yöntemi kullanıldı ve sonuçlar kantitatif olarak bildirildi⁸. Kültür için sedimentten BACTEC 12B şişesine (BACTEC 460TB sistemi, Becton Dickinson, Sparks, Md) ve Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerine (Salubris, Türkiye) ekim yapıldı.

BACTEC 12B şişeleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda izlendi. Kültür şişeleri 6 hafta süre ile inkübe edildi. Üreme indeksi (growth index, GI) ilk 2 hafta haftada iki kez, daha sonraki 4 hafta süresince haftada bir kez ölçüldü. GI>10 düzeyine ulaştığında çikolata agara ekim yapılarak kontaminasyon kontrolü yapıldı. Daha sonra GI≥100'e ulaştığında besiyerinden 0.1 ml alınarak mikroskopik inceleme yapıldı ve kord oluşumu arandı. LJ besiyerleri 8 hafta boyunca inkübe edildi ve oluşan koloni görünümleri incelendi. Kolonilerden EZN boyama ile asidorezistan basillerin varlığı gösterildi. Tanımlamada BACTEC NAP testi kullanıldı ve gereğinde geleneksel biyokimyasal yöntemler (niasin birikimi, nitrat indirgemesi ve ısıya stabil katalaz testleri) ile doğrulandı⁹.

Amplifiye Mycobacterium tuberculosis Direk Testi (AMTD): Bu yöntem üretici firmanın (Amplified MTD Test, Gen-Probe, San Diego, California) önerilerine göre çalışıldı. Çalışma alanı, pipetler ve diğer ekipman eşit oranda sulandırılmış çamaşır suyu ile dekontamine edildi, örnekler güvenlik kabini içinde eklendi. *M.gordonae* ATCC14470 ve *M.tuberculosis* H37Rv suşları negatif ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. RLU (relative light units; bağıl ışık birimi) değerinin ≥500.000 bulunması pozitif, <30.000 olması negatif, 499.000-30.000 kuşkulu olarak değerlendirildi. Kuşkulu bulunan örnekler yeniden çalışıldı ve ikinci değerlendirmede eşik değer 30.000 olarak alındı.

AMTD testi pozitif, kültür negatif olan çelişkili durumlarda, hastaların klinik tabloları ve tedaviye yanıtları sorgulanarak klinik tanılarına ulaşıldı ve AMTD testi yanlış pozitif olguların analizi yapıldı. Test performansının

değerlendirilmesinde duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler kullanıldı. Bu değerlendirme, kültür altın standart alınarak yapıldı. Çelişkili olguların analizinden sonra istatistiksel değerlendirme yineleni.

SONUÇLAR

Araştırmada toplam olarak 267 klinik örnek (170 akciğer, 97 akciğer dışı örnek) retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Akciğer örneklerinin %11'i (19/170) kültür pozitif, %13'ü (22/170) ise AMTD testi pozitifdir. AMTD testi pozitif olan 22 örneğin 16'sı (%73) kültür pozitif, 6'sı (%27) ise kültür negatiftir. Tablo I'de akciğer örneklerinin AMTD testi ve kültür sonuçları karşılaştırılarak gösterilmiştir.

Tablo I. Akciğer Örneklerinin AMTD Testi ve Kültür Sonuçlarının Karşılaştırılması

AMTD Testi	Kültür (n)			Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD ^a (%)	NPD ^b (%)
	Pozitif	Negatif	Toplam				
Pozitif	16	6	22	84	96	73	98
Negatif	3	145	148				
Toplam	19	151	170				

^aPozitif prediktif değer, ^bNegatif prediktif değer.

AMTD testi pozitif, kültür negatif 6 hastanın klinik özellikleri ve tedavi öyküleri geriye dönük olarak incelendiğinde, bu olguların tüberküloz olarak kabul edildiği ve dörtlü antitüberküloz almakta oldukları belirlenmiştir. Tablo II'de bu olguların yayma sonuçları ve klinik tanıları gösterilmiştir.

Tablo II. AMTD Testi Pozitif, Kültür Negatif Sonuç Alınan Hastaların Klinik Özellikleri

Hastalar, Yaş	Örnek	Yayma	Klinik Tanı	Tedavi Öyküsü
MK, 2	BAL	Negatif	Akciğer TB	Var
İÇ, 56	BAL	Negatif	Akciğer kanseri ve TB	Var
NE, 66	BAL	Negatif	TB lenfadenit ve Akciğer TB	Var
HK, 54	Balgam	Pozitif (+)	Akciğer TB	Var
HD, 64	Balgam	Pozitif (+)	Akciğer TB	Var
CY, 78	Balgam	Pozitif (+)	Akciğer TB	Var

BAL: Bronkoalveoler lavaj sıvısı.

AMTD testi negatif, kültür pozitif olan üç hastanın da, akciğer TB olarak tedavi alan hastalar olduğu belirlenmiştir. Bu olgulardan biri TB reaktivasyonu, ikisi ise yeni olgudur. Bu sonuçlar yanlış negatif olarak kabul edilmiştir.

Çelişkili olguların klinik tanıları gözden geçirildikten sonra AMTD testi sonuçları bu kez kültür ve klinik tanı dikkate alınarak yeniden değerlendirilmiştir (Tablo III). Test sonuçları mikroskopik inceleme sonuçlarına göre gruplandırılarak verilmiştir.

Tablo III. Akciğer Örneklerinde AMTD Test Sonuçlarının Yayma Sonuçlarına Göre Kültür ve Klinik Tanı Eşliğinde Yeniden Değerlendirilmesi

ARB Yayma	AMTD	Kültür+Klinik (n)			Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD ^b (%)	NPD ^b (%)
		Pozitif (%)	Negatif	Toplam				
Negatif	Pozitif	7	–	7	88	100	100	99
	Negatif	1	109	110				
	Toplam	8	109	117				
Pozitif	Pozitif	15	–	15	88	100	100	95
	Negatif	2	36	38				
	Toplam	17	36	53				
TOPLAM	Pozitif	22	–	22	88	100	100	98
	Negatif	3	145	148				
	Toplam	25	145	170				

^aPozitif prediktif değer, ^bNegatif prediktif değer.

Araştırmada değerlendirilen toplam 97 akciğer dışı örneğin 5'i (%5) kültür pozitif, 3'ü (%3) AMTD testi pozitif bulunmuştur. Kültür pozitif örneklerin 3'ünde (1 açlık mide sıvısı, 1 plevral sıvı, 1 doku biyopsi örneği) AMTD testi pozitifdir (%60). Kültür pozitif, AMTD testi negatif olan 2 örnek ise TB plörezisi tanısı alan hastalara ait plevral sıvı örnekleridir. Akciğer dışı örneklerin yayma sonuçları incelendiğinde 93'ünün yayma negatif (%96), 4'ünün (%4) yayma pozitif olduğu belirlenmiştir. Yayma pozitif olan örneklerin kültüründe üreme olmamıştır. Tablo IV'de akciğer dışı örneklerin AMTD test sonuçları ile kültür sonuçları karşılaştırılmıştır. Yayma pozitif olguların az olması nedeniyle mikroskopi sonuçlarına göre ayırım yapılmamıştır.

Tablo IV. Akciğer Dışı Örneklerin AMTD Testi ve Kültür Sonuçlarının Karşılaştırılması

AMTD Testi	Kültür (n)			Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD ^a (%)	NPD ^b (%)
	Pozitif	Negatif	Toplam				
Pozitif	3	–	3	60	100	100	98
Negatif	2	92	94				
Toplam	5	92	97				

^aPozitif prediktif değer, ^bNegatif prediktif değer.

TARTIŞMA

Tüberkülozun kontrolünde hızlı tanı önemli rol oynar. Tanıda en hızlı yöntem mikroskopik inceleme olmakla birlikte TB olgularının yaklaşık yarısında basil görülmesi bu yöntemin duyarlılığını düşürmektedir. Bu araştırmada da akciğer tüberkülozu tanısı alan 25 hastanın akciğer örneğinin 17'sinde (%68) yayma pozitif bulunmuştur. Mikroskopik inceleme ile ayrıca TB basili ile TB dışı mikobakterilerin ayırımı yapılamamaktadır. Moleküler yöntemler hızlı sonuç vermelerinin yanı sıra duyarlılık ve özgüllüklerinin mikroskopik incelemenden yüksek olması nedeniyle giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır.

Ticari moleküler kitlerden MTD ve Roche Amplicor MTB ilk kez 1995 yılında yayma pozitif akciğer örnekleri için FDA onayı almıştır. Daha sonra 1998 yılında MTD'nin modifikasyonu olan "Gen-Probe Amplified MTD" (AMTD) testi kullanıma sunulmuş, 2000 yılında yayma negatif akciğer örnekleri için de onaylanmıştır¹⁰. AMTD testinde transkripsiyon temeline dayalı amplifikasyon ve Gen-Probe hibridizasyon tekniğı uygulanmaktadır. Klinik örnekte *M.tuberculosis* kompleksin rRNA'sı hedef alınmaktadır. Amplifikasyonun izotermal koşullarda ve tek tüpte çalışarak yürütölmesi kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Bir başka avantajı, çalışma süresinin 3,5 saat gibi kısa olmasıdır. Ancak sistem içinde internal amplifikasyon kontrolü bulunmadığından inhibitör varlığını araştırmak için kuşku durumlarda basil eklenmiş örnekler ile test tekrarlanmaktadır.

Akciğer ve akciğer dışı örneklerde AMTD testinin performansının değerlendirilmesine ilişkin birçok araştırma yayınlanmıştır³⁻⁷. Bu çalışmalarda akciğer örneklerinde duyarlılık %85,7-100 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir. Bu farklılıkların nedeni, laboratuvar uygulamalarına bağı olabildiğı gibi çalışılan örneğın yayma pozitif veya negatif olmasına ve çalışılan bölgedeki TB prevalansına da bağı olabilir. Çalışmamızda akciğer örneklerde AMTD testinin duyarlılığı %84, özgüllüğü %96 bulunmuştur. Çalışılan olgulardan altı tanesinde AMTD testi pozitif, kültür negatif, üç tanesinde ise AMTD negatif, kültür pozitif bulunmuştur. Moleküler testlerden elde edilen yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların laboratuvarında kalite kontrol programı içinde dikkatle değerlendirilmesi gereklidir. Özellikle yanlış pozitif sonuçlar gereksiz ve toksik ilaç kullanımına, gereksiz hasta izolasyonuna, temaslı taramasına ve yüksek maliyete yol açmaları nedeniyle önem taşırlar. Yanlış negatif sonuçlar ise tedavinin durdurulmasına, hasta izolasyonunun sonlandırılmasına ve hastalığın yayılmasına yol açabilir¹¹⁻¹³. Bu nedenle AMTD testi sonuçlarının, kültür sonuçları alınıncaya kadar izlenmesi ve gerektiğinde laboratuvar uygulamalarının gözden geçirilmesi gereklidir. Bu araştırmada yanlış pozitif olarak değerlendirilen altı olgunun klinik tanıları geriye dönük olarak gözden geçirildiğinde, bu olguların klinik, radyolojik ve tedavi öykülerine dayanılarak TB olarak kabul edildiğı izlenmiştir. Bu nedenle sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Altın standart olarak kültür ve klinik tanı birlikte değerlendirildiğinde AMTD testinin duyarlılığı %88, özgüllüğü %100, PPD %100 ve NPD %98 olarak bulunmuştur. Bu değerler farklı çalışmalarda bildirilen sonuçlara benzerdir³⁻⁷. Çalışmada elde edilen yanlış negatif sonuçların ise örnekteki inhibitörlerin varlığına bağı olabileceğı düşünülmüştür. Hastalık Kontrol ve Önlem Merkezi (CDC), AMTD negatif, yayma pozitif örnekler için ikinci bir örnekle testin tekrarlanmasını önermektedir¹¹. Ancak araştırmanın retrospektif olması nedeniyle bu uygulama yapılamamıştır. Test sırasında inhibitör kontrolünün yapılmaması ise sistemin dezavantajı olarak değerlendirilmelidir.

Yayma pozitif olgularda ve örnekteki basil yükü arttıkça moleküler yöntemlerin duyarlılığının artması beklenir¹⁴⁻¹⁶. Ancak bu araştırmada hem yayma negatif hem de pozitif olgularda AMTD testinin duyarlılığı eşit (%88) bulunmuştur. Bunun nedeninin çalışılan olgularda yayma pozitifliğinin düşük

olmasına (53/170 olgu) bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ancak yayma negatif sekiz TB olgusunun yedisinde AMTD testinin pozitif bulunması, bu grup hastaların erken tanısında testin değerli olduğunu göstermektedir.

Akciğer dışı TB'nin mikrobiyolojik tanısı akciğer TB'den daha zordur. Bunun en önemli nedeni klinik örnekte basil miktarının az olmasıdır¹⁷⁻¹⁹. Bunun dışında steril vücut sıvılarında ve dokularda moleküler testlerin performansını etkileyen inhibitör maddeler bulunmaktadır. Bu nedenler, yaymanın negatif bulunmasına, kültürde etkenin üretilmemesine ve moleküler testlerin duyarlılığının düşmesine yol açar. Yapılan çalışmalarda, kültür ile doğrulanmış akciğer dışı TB olgularının %31'inde yayma, %86'sında ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) pozitif bulunmuştur^{18,19}. Bu çalışmada toplam 97 akciğer dışı örnek test edilmiş ve bu olgulardan beşi kültür ile doğrulanmıştır. AMTD testinin akciğer dışı örneklerdeki duyarlılığı %60, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda bu oranlar sırasıyla %74.3-89.5 ve %100 olarak bildirilmektedir^{3,4,7,17}. Çalışmamızda duyarlılığın düşük bulunmasının bir nedeni, kültür pozitif olguların %5 gibi az oranda olması olabilir. Bu nedenle araştırmanın seçilmiş, klinik kuşkunun yüksek olduğu olgularda yapılması güvenilir verilerin elde edilmesini sağlayacaktır. Bu çalışmada kültür pozitif olan beş örneğin yayması negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu olgulardan üç tanesi AMTD testi ile pozitif olarak saptanmıştır. Yayma negatif akciğer dışı TB olgularında erken tanı için AMTD testinin tanıya yardımcı olacağı düşünülebilir. Ancak moleküler testlerin hiçbirinin akciğer dışı TB tanısı için henüz onaylanmadığı unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, akciğer örneklerinde AMTD testinin duyarlılığı %88, özgüllüğü %100, akciğer dışı örneklerde ise duyarlılığı %60, özgüllüğü %100 olarak değerlendirilmiştir. Hızlı ve güvenilir tanı için test sonuçlarının klinik tanı eşliğinde değerlendirilmesinin doğru olacağı düşünülmüştür. Akciğer dışı TB olgularında duyarlılığın istenen düzeyde olmaması, bu olguların tanısında test sonuçlarının dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Moleküler test sonuçlarının kültür sonuçları ve hastaların klinik tanıları ile birlikte izlenmesi kalite kontrol uygulamaları hakkında önemli bilgiler kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Watterson SA, Drobniewski FA. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. J Clin Pathol 2000; 53: 727-32.
2. Shamputa IC, Rigouts L, Portaels F. Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens. APMIS 2004; 112: 728-52.
3. Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, et al. Comparative evaluation of initial and new versions 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: 684-9.
4. Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C, et al. Comparative evaluation of the new Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* Amplified Direct Test and the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 3601-4.

5. Alcalá L, Ruiz-Serrano MJ, Hernangomez M, et al. Evaluation of the upgrated Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (Gen-Probe) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41: 51-6.
6. Chedore P, Jamieson FB. Routine use of the Gen-Probe MTD2 Amplification Test for detection for *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in a large public health mycobacteriology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 185-91.
7. Scarpola C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Scagnelli M, Piersimoni C. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Amplified Direct Test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1559-62.
8. Ebersole LL. Acid fast staining procedures, p: 3.5.1-11. In: Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (Vol 1). 1992, American Society for Microbiology, Washington, DC.
9. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. *Mycobacterium*, pp: 399-437. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 1999, ASM Press, Washington, DC.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49: 593-4.
11. Somoskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, et al. False positive results for *Mycobacterium celatum* with the Accuprobe *Mycobacterium tuberculosis* complex assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2743-5.
12. Jorgensen JH, Salinas JR, Paxson R, Magnon K, Patterson JE, Patterson TF. False-positive Gen-Probe Direct *Mycobacterium tuberculosis* Amplification Test results for patients with pulmonary *M.kansasii* and *M.avium* infections. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 175-8.
13. Tjhie JHT, Van Belle AF, Dessens-Kroon M, Van Soelingen 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: 2311-2.
14. Gallina M, Troupioti P, Rocco G, Sensalari G, Libanori E. Predicting culture results for *Mycobacterium tuberculosis*: Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test and acid fast microscopy. *Chest* 2000; 118: 28-32.
15. Nelson SM, Deike MA, Cartwright CP. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 467-9.
16. Stone BL, Burman WJ, Hildred MV, et al. The diagnostic yield of acid-fast bacillus smear positive sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1030-1.
17. Woods GL, Bergmann JS, Williams-Bouyer N. Clinical evaluation of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in select nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 747-9.
18. Chakravorty S, Tyagi JS. Novel multipurpose methodology for detection of mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens by smear microscopy, culture and PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2697-702.
19. Chakravorty S, Sen MK, Tyagi JS. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4357-62.