

Valutazione del sistema BDProbeTec ET per la diagnosi molecolare di tubercolosi

L. Bianchi, L. Rindi, N. Lari, D. Bonanni e C. Garzelli*

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa, I-56127 Pisa

Riassunto. Negli ultimi anni sono stati allestiti, e resi commercialmente disponibili, vari *test* molecolari per la diagnosi rapida di infezione tubercolare. In questo lavoro sono state valutate le prestazioni del sistema BDProbeTec ET (Becton Dickinson), un sistema semiautomatico basato sulla tecnologia SDA (Strand Displacement Amplification), utilizzata per l'amplificazione di sequenze specifiche di DNA di *Mycobacterium tuberculosis*. A tale scopo, sono stati saggiati 469 campioni clinici ed i dati ottenuti sono stati confrontati con quelli derivati dalle corrispondenti colture in terreno liquido. Sensibilità e specificità del sistema BDProbeTec ET sono risultate, rispetto all'esame colturale, rispettivamente del 93,1% e 95,7%, che, dopo la risoluzione delle discrepanze, sono salite a 93,9% e 98,4%. Più in particolare, sensibilità e specificità sono risultate del 100% per i campioni positivi all'esame microscopico, e del 83,3% e 95,7% per i campioni negativi all'esame microscopico. Il sistema BDProbeTec ET ha inoltre mostrato valori di sensibilità e di specificità di 93,5% e 95,9% per i campioni respiratori, e di 90,0% e 95,4% per i campioni di origine non respiratoria. I risultati ottenuti suggeriscono che il sistema BDProbeTec ET può rappresentare un metodo attendibile e complementare all'esame colturale convenzionale per la diagnosi di tubercolosi.

Abstract. In the last years a number of molecular assays for the rapid diagnosis of tuberculosis have been set up and made commercially available. In this study we have evaluated the performance of the BDProbetec ET (Becton Dickinson), a semiautomated system based on the SDA (Strand Displacement Amplification) technology for the amplification of specific DNA sequences of *Mycobacterium tuberculosis*. Results obtained using the BDProbetec ET system on a total of 469 clinical specimens were compared with those of liquid cultures. Sensitivity and specificity were 93.1% and 95.7%, respectively; after resolution of discrepancies, these values rose to 93.9% and 98.4%. In particular, sensitivity and specificity for microscopy-positive specimens were 100%, while for microscopy-negative were 83.3% and 95.7%, respectively. Sensitivity and specificity values obtained with respiratory specimens were 93.5% and 95.9%, and those obtained with nonrespiratory specimens were 90.0% and 95.4%. Our results indicate that the BDProbetec ET system may represent a reliable and complementary tool in support to the conventional cultures for the diagnosis of tuberculosis.

Introduzione

La tubercolosi (TB) rappresenta ancora oggi una malattia infettiva con un elevato tasso di mortalità e si prevede che la sua incidenza incrementerà sostanzialmente nei prossimi anni, in particolare nei paesi in via di sviluppo (8; 16). Analogamente ad altri paesi industrializzati, anche in Italia, la progressiva diminuzione dell'incidenza di TB, che è stata osservata dagli anni '50 in poi, è stata seguita da una inversione di tendenza; a partire dai primi anni '80 l'incidenza della TB polmonare non ha subito un ul-

teriore calo, rimanendo relativamente stabile, mentre l'incidenza di TB extrapolmonare è aumentata rapidamente. Inoltre, l'insorgenza di casi di TB con farmacoresistenza multipla rappresenta un serio problema di salute pubblica a livello mondiale.

Una rapida diagnosi e l'inizio della chemioterapia specifica sono le basi per un efficace controllo della TB. Oggigiorno, l'isolamento colturale rappresenta il solo metodo che permette di porre diagnosi di infezione tubercolare, ma l'isolamento e l'identificazione di *Mycobacterium tuberculosis* richiedono tempi necessariamente lunghi. Per questo motivo,

negli ultimi anni, si sono intensificati gli sforzi per sviluppare *test* molecolari rapidi, basati sull'amplificazione degli acidi nucleici, per la ricerca del bacillo tubercolare direttamente nei campioni clinici. Tra questi, recentemente è stato messo a punto un sistema semiautomatico, noto con il nome commerciale di BDProbeTec ET (Becton Dickinson, USA), che adotta la tecnologia SDA (Strand Displacement Amplification) quale metodo di amplificazione genica (17; 19) ed il trasferimento di energia fluorescente come metodo di rilevazione dell'amplificato. Nel presente lavoro viene valutato il sistema BDProbeTec ET, confrontando i dati derivati dall'analisi molecolare SDA di campioni clinici, sia di origine polmonare che extra-polmonare, con i risultati dell'isolamento colturale.

Materiali e metodi

Campioni

Sono stati processati 469 campioni clinici, di cui 322 di origine respiratoria e 147 di origine extrapolmonare, pervenuti al laboratorio di micobatteriologia del servizio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana per la ricerca di bacilli alcool-acido resistenti (Tabella 1).

Trattamento dei campioni clinici

I campioni clinici, ad eccezione del liquor che è stato utilizzato senza subire alcun trattamento, sono stati decontaminati, fluidificati e concentrati secondo procedure *standard* (7). Nel caso di prelievi biopistici, prima del trattamento decontaminante, è stata effettuata una digestione meccanica del tessuto mediante un omogeneizzatore Stomacher (PBI International), sospendendo il materiale in 5 ml di soluzione fisiologica sterile.

Per la decontaminazione e fluidificazione dei campioni è stata utilizzata una soluzione di N-acetil-L-cisteina e idrossido di sodio (NALC-NaOH) (MycPrep, BBL), costituita da NALC allo 0.03%, NaOH al 2% e citrato e trisodico all'1.4%. Tale soluzione è stata aggiunta nelle provette da centrifuga in un volume uguale a quello del campione in esse contenuto ed è stata lasciata agire a temperatura ambiente per 15 minuti, previa agitazione su *vortex* per liquefare il materiale clinico. Le sospensioni sono poi state neutralizzate mediante aggiunta di tampone fosfato (Tampone fosfato BBL MycoPrep), costituito da fosfato disodico allo 0.47% e fosfato monopotassico allo 0.45%, pH 6.8, e centrifugate a 4200 x g per 20 minuti. Il supernatante è quindi stato decantato ed il sedimento sospeso in 1.5 ml del suddetto tampone fosfato.

Tabella I. Origine dei campioni clinici

Campioni clinici	Totale
Espettorato	245
Bronco-aspirato	11
Lavaggio bronco-alveolare	47
Liquido pleurico	19
Liquor	15
Biopsia	16
Urina	59
Aspirati	9
Altri materiali ^a	48

^aComprendono pus, liquido gastrico, liquido cistico, materiale duodenale, tamponi.

La sospensione ottenuta è stata utilizzata per l'allestimento dell'esame microscopico, eseguito mediante colorazione di Ziehl-Neelsen, per l'inoculo nei terreni di coltura, e per l'esecuzione del *test* molecolare SDA.

Isolamento colturale

L'isolamento colturale è stato effettuato mediante il sistema fluorimetrico BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson). Alle provette di coltura MGIT sono stati aggiunti 0.8 ml di supplemento di crescita contenente OADC (acido oleico, albumina, poliossietilene stearato, destrosio e catalasi) e la miscela antibiotica PANTA (polimixina B, anfotericina B, acido nalidixico, trimethoprim, azlocillina) e 0.5 ml di sospensione concentrata del campione. Le colture sono state incubate a 37°C per un periodo ininterrotto di sei settimane e monitorate automaticamente per rilevare l'eventuale crescita microbica. Le colture positive sono state esaminate microscopicamente per la presenza di bacilli acido-resistenti, i quali sono stati quindi identificati con sonde molecolari specifiche (AccuProbe, Gen-Probe) oppure mediante sequenziamento nucleotidico dell'rDNA 16S (15).

Analisi BDProbetec ET

L'analisi dei campioni digeriti e decontaminati è stata eseguita, quando possibile, il giorno stesso dell'arrivo al laboratorio, oppure in sessioni di lavoro con frequenza settimanale, previa conservazione dei campioni a 4°C. In taluni casi sono stati utilizzati campioni conservati a -20°C, per non più di 50 giorni.

La procedura del *test* si articola in tre fasi:

1. Estrazione

Allo scopo di rimuovere gli inibitori, 500 µl del sedimento di ciascun campione, ottenuto mediante decontaminazione con NALC-NaOH, sono stati trasferiti in provette, dove era stato posto 1 ml di tampone di lavaggio DTB1 (contenente urea, dimetilsolfossi-

do, glicerolo e idrossido di sodio), quindi agitati al *vortex* per 5 secondi e centrifugati a 12.200 x g per 3 minuti. Dopo decantazione del sovrantante, i *pellet* sono stati incubati in apposito forno per 30 minuti a 105°C per inattivare eventuali micobatteri presenti, e quindi centrifugati per 10 secondi. Per l'estrazione del DNA dalle cellule micobatteriche, i campioni, dopo l'aggiunta di 100 µl di tampone lisante DTB2 (contenente idrossido di potassio), sono stati sonicati per 45 minuti a 65°C; quindi nuovamente sottoposti a breve centrifugazione. I campioni, in seguito all'aggiunta di 600 µl di tampone neutralizzante DTB3 (contenente idrossido di potassio, dimetilsolfossido e glicerolo), sono stati agitati al *vortex* per 5 secondi, e nuovamente centrifugati per altri 10 secondi.

In ogni sessione di lavoro sono stati utilizzati due controlli, uno positivo ed uno negativo, forniti nel *kit*. I controlli sono stati ricostituiti, subito prima dell'uso, con 100 µl di tampone lisante e 600 µl di tampone neutralizzante, agitati al *vortex* per 5 secondi e centrifugati per altri 10.

2. Ibridizzazione

150 µl di ciascun campione e dei controlli sono stati trasferiti nei rispettivi pozzetti di "priming" collocati nell'apposita micropiastra di metallo, determinando in tal modo la reidratazione dei reagenti essiccati presenti sul loro fondo (*primer* di amplificazione, *bumper*, sonde di rivelazione, dNTP e controllo interno di amplificazione (IAC)). La micropiastra, con i pozzetti di *priming*, è stata coperta ed incubata per almeno 20 minuti (massimo 6 ore) a temperatura ambiente. Per assicurare la specificità dell'ibridizzazione la suddetta micropiastra è stata quindi incubata a 72,5°C per 10 minuti, nell'apposito termoblocco di *priming*. Successivamente 100 µl di ciascun campione e dei controlli sono stati trasferiti dai pozzetti di *priming* a quelli di amplificazione, preriscaldati per 10 minuti nel termoblocco a 54°C. I pozzetti di amplificazione contengono, essiccati sul fondo, oltre ai dNTP, la DNA polimerasi e l'endonucleasi di restrizione *BsoBI*; questi sono stati reidratati dall'aggiunta del campione. I pozzetti di amplificazione nella micropiastra, sono stati immediatamente sigillati per impedire le contaminazioni.

3. Amplificazione e rivelazione

La micropiastra con i pozzetti di amplificazione è stata posta, entro un tempo massimo di 3 minuti, nello strumento BDProbeTec ET per l'incubazione di 1 ora a 52,5°C. La generazione dei prodotti di amplificazione, rivelata dall'incremento di fluorescenza, è monitorata dal lettore ogni 60 secondi.

Interpretazione dei risultati

I risultati vengono riportati in valori numerici, espressi in unità "MOTA" (*metric other than acceleration*), relativi sia a ciascun campione o controllo

che ai rispettivi IAC. L'indice MOTA, usato per valutare l'entità del segnale generato in seguito all'amplificazione, non ha un valore quantitativo e non è interpretabile come indice della quantità di acido nucleico presente nel campione. Esso corrisponde all'area sotto la curva dei segnali fluorescenti, corretta rispetto al *background*. Valori superiori a 3.400 vengono considerati positivi a prescindere dal valore dello IAC. Valori inferiori a 3.400 vengono considerati negativi se il valore dello IAC è maggiore di 5.000 e indeterminati se tale valore è inferiore a 5.000. In quest'ultimo caso il campione deve essere ritestato e il risultato riportato in base al valore ottenuto dalla ripetizione del *test*.

Risoluzione delle discrepanze

I dati discrepanti sono stati interpretati, ove possibile, sulla base dei risultati di precedenti colture e di informazioni cliniche.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati comprende la determinazione di sensibilità, specificità e dei valori predittivi positivo (VPP) e negativo (VPN) del saggio.

Risultati e discussione

Dei 469 campioni, 45 sono risultati positivi all'esame microscopico, 80 positivi all'esame colturale e 89 positivi al *test* di amplificazione. Degli 80 isolati cresciuti in coltura, 72 appartenevano al complesso tubercolare (*M. tuberculosis* complex, MTBC), 3 sono stati identificati come *Mycobacterium chelonae*, 2 come *Mycobacterium fortuitum*, 2 come *Mycobacterium xenopi* ed 1 come membro del *Mycobacterium avium* complex (Tabella 2).

Dei 469 campioni processati, 22, di cui 6 positivi all'analisi BDProbeTec e 1 positivo all'esame microscopico, sono stati eliminati dallo studio a causa di contaminazioni della coltura; infatti, anche se la presenza di contaminanti non è influente per quanto ri-

Tabella II. Specie micobatteriche isolate da campioni respiratori e non respiratori

Specie	Coltura	
	Campioni respiratori	Campioni non respiratori
<i>M. tuberculosis</i> complex	62	10
<i>M. chelonae</i>	3	-
<i>M. avium</i> complex	1	-
<i>M. fortuitum</i>	2	-
<i>M. xenopi</i>	2	-
Totale	70	10

Tabella III. Sensibilità, specificità, VPP e VPN del sistema BDProbeTec ET rispetto all'isolamento colturale

Campioni	Risultati BDProbeTec ET				Sensibilità (%)	Specificità (%)	VPP (%)	VPN (%)
	Positivi	Negativi	Positivi	Negativi				
	Coltura MTBC positiva	Coltura MTBC negativa	Coltura MTBC positiva	Coltura MTBC negativa				
Totali	67	5	16	359 ^a	93,1	95,7	80,7	98,6
Microscopici pos.	42	-	-	2 ^b	100	100	100	100
Microscopici neg.	25	5	16	357 ^c	83,3	95,7	61,0	98,6
Respiratori	58	4	10	234 ^a	93,5	95,9	85,3	98,3
Microscopici pos.	41	-	-	2 ^b	100	100	100	100
Microscopici neg.	17	4	10	232 ^c	80,9	95,9	63,0	98,3
Non respiratori	9	1	6	125	90,0	95,4	60,0	99,2
Microscopici pos.	1	-	-	-	100	-	100	-
Microscopici neg.	8	1	6	125	88,8	95,4	57,1	99,2

^ainclusi 8 MOTT; ^b2 MOTT; ^cinclusi 6 MOTT

guarda l'amplificazione, la mancanza del confronto con la coltura, avrebbe reso tali dati non valutabili. Tra i rimanenti 447 campioni, 67 sono risultati positivi sia in coltura che con il BDProbeTec ET e 350 negativi con entrambi i *test*. Sedici campioni sono risultati negativi in coltura e positivi con il BDProbeTec ET e 13 positivi soltanto in coltura. Di quest'ultimi, 5 isolati appartenevano al MTBC, gli altri erano micobatteri non tubercolari (MOTT). Un solo campione è risultato negativo in coltura ed indeterminato con il BD ProbeTec ET, in quanto lo IAC non era stato amplificato; la ripetizione del *test* molecolare ha dato risultato negativo per MTBC, in accordo con la coltura; i campioni negativi sia alla coltura che con il BDProbeTec ET sono quindi risultati 351.

Dei 72 campioni dai quali è stato isolato MTBC, 67 sono risultati BDProbeTec ET-positivi e 5 negativi, mentre dei 375 campioni coltura-negativi, 16 sono risultati BDProbeTec ET-positivi, 359 negativi. La sensibilità, la specificità, il VPP e il VPN del sistema BDProbeTec ET, sono quindi risultati, in confronto all'esame colturale, pari rispettivamente a 93,1, 95,7, 80,7 e 98,6% (Tabella 3).

Dei 44 campioni positivi all'esame microscopico, 42 sono risultati positivi sia all'esame colturale che al *test* BDProbeTec ET. Fra i campioni microscopicamente positivi, sensibilità e specificità sono risultate pertanto del 100%. Dei 403 campioni con microscopia negativa, 41 (di cui 25 positivi per MTBC in coltura) sono risultati BDProbeTec ET-positivi, e 362 (di cui 5 coltura-positivi) -negativi. Tra i campioni negativi all'esame microscopico, quindi, i valori di sensibilità e specificità sono risultati rispetti-

vamente pari al 83,3 e al 95,7 %, rispetto all'esame colturale.

Considerando quindi i risultati ottenuti relativamente ai campioni respiratori e non respiratori, la concordanza per i campioni respiratori tra i dati del *test* ProbeTec ET ed i risultati dell'isolamento colturale sale a 95,4%. Per tali campioni, sensibilità e specificità sono risultate pertanto pari al 93,5 e al 95,9% rispettivamente; come atteso, la sensibilità per quelli positivi all'esame microscopico è risultata chiaramente più alta (100%) rispetto a quelli negativi (80,9%). Per quanto riguarda i 141 campioni non respiratori, la concordanza tra amplificazione e coltura è risultata essere del 95%, con una sensibilità del *test* molecolare del 90,0 %.

Come illustrato in Tabella 4, la valutazione del saggio molecolare è stata condotta anche considerando separatamente i diversi campioni clinici. Sebbene, in virtù dell'esiguo numero di campioni MTBC positivi, i risultati ottenuti costituiscano soltanto dei dati preliminari, questi sembrano comunque incoraggiare un più ampio studio delle prestazioni del sistema ProbeTec ET relativamente ai campioni di origine extra respiratoria, al fine di valutarne l'applicabilità diagnostica proprio in quest'ambito. Ancora oggi, infatti, i campioni di origine extrapulmonare rappresentano uno dei principali problemi della diagnostica della tubercolosi, poichè spesso contengono uno scarso numero di bacilli (4; 10; 11) e, non di rado, anche inibitori (13), fattori che ne inficiano pesantemente la sensibilità diagnostica.

I casi in cui si è avuta discordanza fra i risultati di BDProbeTec ET e coltura (Tabella 3) sono stati 16. Di questi, 8 campioni apparentemente falsi positivi

Tabella IV. Sensibilità e specificità del sistema BDProbeTec ET rispetto all'isolamento colturale in campioni non respiratori

Tipo di Campione	Risultato BDProbeTec ET				Sensibilità (%)	Specificità (%)
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		
	Coltura MTBC positiva		Coltura MTBC negativa			
Urine	-	-	1	53	n.d.	98,1
Biopsie	2	-	1	13	100	92,8
Liquor	-	1	-	14	n.d.	100
Aspirati	3	-	1	3	100	75,0
Tamponi	-	-	2	7	n.d.	77,7
Altro*	4	-	1	35	100	97,2

*: Pus, liquido gastrico, liquido cistico, materiale duodenale. n.d., non determinata.

provenivano da pazienti con diagnosi recente di TB in corso di terapia antitubercolare specifica; gli altri 2 provenivano da pazienti con TB pregressa. Tali campioni sono stati quindi considerati veri positivi. Relativamente ai rimanenti 6 falsi positivi, non è stato possibile ottenere informazioni cliniche sui pazienti da cui i campioni provenivano. Una volta risolte le discrepanze, sensibilità, specificità e VPP del sistema BDProbeTec ET sono saliti a 93,9, 98,4, 92,8% rispettivamente, in linea con gli altri valori già riportati in letteratura (3). Per i 10 campioni risultati inizialmente falsi positivi, e considerati quindi veri positivi dopo la risoluzione delle discrepanze, l'ipotesi più verosimile pare la presenza di bacilli morti o di tracce di acidi nucleici che permangono anche per mesi dopo la guarigione clinica.

Per quanto riguarda i 5 campioni risultati positivi all'isolamento colturale ma non al *test* ProbeTec ET, si ritiene che le false negatività siano, in gran parte, attribuibili alla minor sensibilità del *test* di amplificazione rispetto all'esame colturale; tali campioni erano, infatti, pauci-bacillari, come indicato dalla negatività dell'esame microscopico. Esclusa, grazie alla presenza dello IAC, l'interferenza degli inibitori, i risultati falsi negativi sembrano imputabili ad errori di campionamento, possibili nei campioni con bassa carica batterica che presentano spesso una distribuzione non uniforme dei bacilli. Tre campioni provenivano, infatti, da altrettanti pazienti risultati, precedentemente o successivamente, positivi al BDProbeTec ET; tale evenienza conferma, quindi, l'utilità della pratica di *testare* più di un campione (fino ad un massimo di 3) per ogni paziente. I risultati falsamente negativi del *test* BDProbeTec ET confermano quindi il ruolo delle tecniche di amplificazione quali sistemi complementari, ma non sostitutivi, dell'esame colturale, che resta, quindi, il sistema di riferimento per la diagnosi di TB.

Conclusioni

In generale, il sistema BDProbeTec ET ha dimostrato una eccellente sensibilità per i campioni positivi all'esame microscopico, seppur la sensibilità sia da migliorare per i campioni negativi all'esame microscopico. E' utilizzabile anche con campioni di origine extra-polmonare e consente il monitoraggio della presenza di inibitori. Tali considerazioni ci inducono a considerare di indubbio vantaggio l'introduzione nella pratica di laboratorio del sistema BDProbeTec ET come complemento dell'esame microscopico e colturale. In particolare, tenendo presente che l'introduzione dei metodi molecolari nei laboratori di diagnostica nasce dall'esigenza di una rapida diagnosi, il sistema BDProbeTec ET può esser messo a confronto con l'unico altro sistema rapido non molecolare esistente, l'esame microscopico, rispetto al quale ha dimostrato di possedere più elevate sensibilità e specificità, caratteristiche che rappresentano, invece, il limite della microscopia. I valori di sensibilità e di specificità ottenuti con il BDProbetec ET cadono entro il *range* di quelli ottenuti con altri sistemi di amplificazione disponibili commercialmente, quali Amplicor, AMTD e LCx (1; 2; 5; 12; 14; 18; 20), come pure di quelli conseguiti in altri studi sul sistema BDProbetec ET (3; 6, 9).

Da un punto di vista più prettamente pratico, ad eccezione di una prima fase di preparazione del campione, il sistema è quasi completamente automatico e l'intervento dell'operatore è ridotto al minimo; reagenti e controlli, forniti nel *kit*, non necessitano di alcuna preparazione; infine, poiché l'uccisione dei batteri avviene all'inizio della procedura, nelle restanti fasi della seduta di lavoro non vi è necessità di cappe biologiche. Queste particolarità rendono, dunque, il sistema BDProbeTec ET facilmente inseribile nel flusso di lavoro del laboratorio diagnostico.

Bibliografia

1. Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Manzano JR, Rodrigo C, Cardona PJ, Padilla E. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 35, 1996-2002, 1997.
2. Beavis KG, Lichty MB, Jungkind DL, Ginger O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 33, 2582-2586, 1995.
3. Bergmann JS, Keating WE, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 38, 863-865, 2000.
4. Gamboa F, Manterola JM, Viñado B, Matas L, Giménez M, Lonca J, Manzano JR, Rodrigo C, Cardona PJ, Padilla E, Domínguez J, Ausina V. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 35, 307-310, 1997.
5. Ichiyama S, Yilnuma Y, Tawada Y, Yamori S, Hasegawa Y, Shimokata K, Nakashima M. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche PCR microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 34, 130-133, 1996.
6. Johansen IS, Thomsen VO, Johansen A, Andersen P, Lundgren B. Evaluation of a new commercial assay for diagnosis of pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21, 455-460, 2002.
7. Kent PT, Kubica GP. Specimen collection and transportation. In: Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. US Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, 21-30, 1985.
8. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the world health organization. *Tubercle* 72, 1-6, 1991.
9. Mazzarelli G, Rindi L, Piccoli P, Scarparo C, Garzelli C, Tortoli E. Evaluation of the BDProbetec ET system for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary samples: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 41, 1779-1782, 2003.
10. O'Sullivan CE, Miller DR, Schneider PS, Roberts GD. Evaluation of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test by using respiratory and non-respiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol* 40, 1723-1727, 2002.
11. Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EMI, Welsker HM, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 34, 834-841, 1996.
12. Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, Weber R. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *J Clin Microbiol* 32, 918-923, 1994.
13. Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C, Penati V, Nista D, Bornigia S, Laccini C, Scagnelli M, Santini G, De Sio G. 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* 36, 3601-3604, 1998.
14. Rohner P, Jahn EIM, Ninet B, Ionati C, Weber R, Auckenthaler R, Pfyffer GE. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis with the LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay and comparison with conventional diagnostic techniques. *J Clin Microbiol* 36, 3046-3047, 1998.
15. Rogall T, Flohr T, Böttger EC. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 136, 1915-1920, 1990.
16. Snider ED, Raviglione M, Kochi A. Global burden of tuberculosis. In: Bloom BR, eds. ASM, Washington DC: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control 3-11, 1994.
17. Spargo CA, Haaland PD, Jurgensen SR, Shank DD, Walker GT. Chemiluminescent detection of strand displacement amplified DNA from species comprising the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Cell Probes* 7, 395-404, 1993.
18. Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 35, 2424-2426, 1997.
19. Walker GT. Empirical aspects of Strand Displacement Amplification. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor. New York: PCR methods and applications, 1-6, 1993.
20. Wang SX, Tay L. Evaluation of three nucleic acid amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 37, 132-134, 1999.