

Vergleich der Polymerase-Ketten-Reaktion und der isothermen Amplifikation in der Mykobakterien-Diagnostik – praktische Aspekte und vorläufige Ergebnisse

A comparison of the polymerase chain reaction (PCR) and isothermic amplification methods in mycobacterial diagnostics – Practical aspects and preliminary results

F.-J. Schmitz, Sabine Krämer, H.-P. Heinz

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurden $n=387$ Materialien von $n=286$ Patienten auf das Vorhandensein von Mykobakterien untersucht. Als Nachweismethoden dienten hierbei neben den konventionellen Verfahren (Festagar-Kultur mit nachfolgender biochemischer Differenzierung, Flüssigkultur mit radiometrischem Nachweis und anschließender Gensonden-Identifizierung, mikroskopischer Nachweis) molekularbiologische Techniken wie die PCR und die isotherme Amplifikation. In dieser Arbeit kamen dabei die *Amplifor*[®] M. tuberculosis complex Test-PCR sowie der *Amplified*[®] M. tuberculosis complex Direkt-Test zur isothermen Amplifikation zum Einsatz. Die vorläufigen Daten zeigen, daß beide molekularbiologischen Verfahren eine Sensitivität von ca. 90 % sowie eine Spezifität von $\geq 99\%$ aufweisen. Der *Amplified*[®] Test zeigt einige praktische Vorteile gegenüber der PCR-Methode. Besonders sollte in diesem Zusammenhang das relativ einfache Handling und die Möglichkeit der Testdurchführung in nur einem Röhrchen mit einer daraus resultierenden geringeren Kontaminationsgefahr betont werden. Mit beiden Methoden ist der Mykobakterien-nachweis innerhalb von Stunden direkt aus dem Patientenmaterial möglich – bei vergleichbar guter Zuverlässigkeit und Sensitivität.

Schlüsselwörter

Mykobakterien – konventionelle Identifizierung – PCR – isotherme Amplifikation

Summary

In the present study $n=387$ samples from $n=286$ patients were analyzed for the presence of mycobacteria. In addition to conventional techniques (solid agar culture with subsequent biochemical differentiation, liquid culture with

radiometric proof and subsequent geneprobe identification, microscopic proof), we also utilized biomolecular techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) and isothermic amplification. In this work we used the *Amplifor*[®] M. tuberculosis complex test-PCR and the *Amplified*[®] M. tuberculosis complex direct test. The preliminary data indicate that both biomolecular techniques have a sensitivity of ca. 90 % and a specificity of 99 %. The *Amplified*[®] test has more practical advantages than the PCR method. Some, in particular, are its relatively easy handling and the possibility of performing the test with only one test tube, which results in a lower risk of contamination. Both methods provide detection of mycobacteria within hours in patient samples, and the reliability and sensitivity of both tests is comparably high.

Key words

Mycobacteria – conventional identification – PCR – isothermic amplification

Einleitung

Die Zunahme der Tuberkulose weltweit, das vermehrte Auftreten hochresistenter Tuberkulose-Stämme und die gesteigerte Vulnerabilität abwegeschwächter HIV-Patienten gegenüber Mykobakterien-Infektionen verdeutlichen die Bedeutung einer sensitiven, spezifischen und schnellen Mykobakterien-Diagnostik im mikrobiologischen Routine-Labor.

Durch die Einführung radiometrischer Nachweisverfahren aus Flüssigkulturen (Bactec[®]-System) in Kombination mit Gen-Sonden-Tests zur Mykobakterien-Identifizierung konnte die Zeit bis zur Übermittlung eines Befundes im Vergleich zur konventionellen Anzucht auf festen Nährböden mit nachfolgender biochemischer Differenzierung deutlich verkürzt werden. Aber sowohl die

radiometrischen als auch die konventionellen Nachweisverfahren erfordern ein kulturelles Wachstum und erlauben keinen direkten Nachweis säurefester Stäbchen aus dem Patientenmaterial. Ein solcher Direktnachweis ist mikroskopisch erst ab 10^4 CFU möglich.

Die PCR hat in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit eine revolutionäre Entwicklung im Bereich der mikrobiologischen Diagnostik eingeleitet. Die erwarteten Vorteile sollen in der sehr hohen Sensitivität und der Möglichkeit des Mykobakterienachweises und der Identifizierung innerhalb weniger Stunden bis Tage liegen. Dabei wird der PCR-Einsatz in der Mykobakterien-Diagnostik kontrovers diskutiert [1–5]. In letzter Zeit wurden auch alternative Amplifikationsmethoden entwickelt, u. a. die isotherme Amplifikation.

In der vorliegenden Arbeit wurden $n = 387$ unterschiedliche Materialien von $n = 286$ Patienten mit Hilfe des *Amplicor*® M. tuberculosis complex Tests (PCR) und des *GEN-PROBE Amplified*® Mycobacterium tuberculosis complex Direkt-Tests (isotherme Amplifikation) analysiert. Der *AF*-Test basiert auf der isothermen Amplifikation spezifischer rRNA-Sequenzen über DNA-Zwischenprodukte. Die Detektion der amplifizierten rRNA erfolgt über die schon im Kulturbestätigungstest der Fa. Gen Probe® erprobten DNA-Sonden.

Zum Vergleich mit diesen beiden neuen molekularbiologischen Verfahren wurde auch die bisher gebräuchliche Routineanalytik unseres Labors durchgeführt.

Diese besteht im einzelnen aus:

- dem radiometrischen Nachweis aus Flüssigkulturen (Bactec®-System),
- verschiedenen DNA-Sonden-Hybridisierungstesten zur Erreger-Identifizierung,
- der konventionellen Anzucht auf Festnährböden mit anschließender biochemischer Differenzierung sowie dem
- mikroskopischen Direktnachweis säurefester Stäbchen im Untersuchungsmaterial (Färbung nach Ziehl-Neelsen).

Abkürzungen:

- AC = *Amplicor*® M. tuberculosis complex Test, Fa. Roche
 AF = *Amplified*® M. tuberculosis complex Direkt Test, Fa. Gen-Probe
 CFU = Colony Forming Units
 GI = Growth Index
 M. = Mykobakterium
 MTC = Mycobacterium tuberculosis complex (bestehend aus: M. microti, M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum)
 OD = Optical Density
 PCR = Polymerase Chain Reaction
 RLU = Relative Lichteinheiten
 TMB = Tetramethylbenzidin

Material und Methoden

Insgesamt wurden $n = 387$ unterschiedliche Materialien von $n = 286$ Patienten mit den oben beschriebenen Verfahren auf das Vorhandensein von Mykobakterien untersucht.

Im einzelnen standen folgende Materialien für die Untersuchung zur Verfügung:

- Sputum, $n = 190$
- Bronchialsekret, Bronchiallavage, $n = 162$
- Magensaft, $n = 25$

Mikroskopischer Direktnachweis nach Ziehl-Neelsen-Färbung

Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung handelt es sich um eine Standardfärbung zum direkten Nachweis von säurefesten Stäbchen. Sie wurde entsprechend den Empfehlungen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DIN-Nr. 58943, 1991) durchgeführt. Ein mikroskopischer Direktnachweis erfordert mindestens eine Keimzahl von 10^4 – 10^5 pro ml Probe. Bei den niedrigen Keimzahlen in vielen Untersuchungsmaterialien gelingt der Direktnachweis daher häufig nicht. Eine Spezies-Differenzierung läßt sich nicht oder nur sehr ungenau treffen.

Kulturverfahren zur Anzucht von Mykobakterien

Vor einer Kultivierung ist das Patientenmaterial einer selektiven Dekontamination zu unterziehen, um evtl. vorhandene Begleitkeime zu unterdrücken. Aufgrund des langsamen Wachstums der Mykobakterien benötigt ihr kultureller Nachweis auf dem von uns verwandten Festagar-Medium nach Löwenstein-Jensen in der Regel 4–8 Wochen. Danach kann aufgrund der Kolonie-Morphologie und des Pigmentverhaltens eine grobe Spezies-Einteilung vorgenommen werden. Als negativ kann eine Kultur ohne sichtbares Wachstum erst nach ca. 8 Wochen definiert werden.

Identifizierung von Mykobakterien über kulturmorphologische und biochemische Differenzierungen

Die Differenzierung von Mykobakterien nach morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten stellt zur Zeit noch immer die Methode der Wahl in den meisten mykobakteriologischen Routinelaboratorien dar. In Tabelle 1 sind die in unserem Haus angewendeten 18 Differenzierungsparameter, z. T. mit Inkubationszeiten, aufgeführt. Die meisten dieser biochemischen Tests, die erst nach Anzucht der Mykobakterien eingesetzt werden kön-

Tabelle 1. Konventionelle Differenzierungsparameter in der Mykobakterien-Diagnostik mit Angabe der Inkubationszeit der biochemischen Tests

Konventionelle Differenzierung Bestimmungparameter	Inkubationszeiten der biochemischen Tests
1. Wuchsverhalten	
2. Pigmentbildung	
3. Cordbildung	
4. Kletterphänomen	
5. Nitrat-Reduktase-Test	2 Stunden
6. Niacin-Test	30 Minuten
7. BSH-Brenzschleimsäurehydrazid	∅
8. Toluidinblau	∅
9. Semicquantitative Katalase	14 Tage
10. Hitzefeste Katalase 68° C	1 Stunde
11. Arylsulfate	3 Tage
12. Phosphatase	24 Stunden
13. Pyrazinamidase	4 Tage
14. Urease	2 Stunden
15. Amidreihe	20–40 Stunden
16. Zuckerreihe	8–10 Tage
17. Ciprofloxacin-Testblättchen	∅
18. Tweenhydrolyse	Auswertung nach 3, 7 und 10 Tagen

∅ = Keine weitere Inkubationszeit, Beurteilung des Wachstums mit + oder -

nen, sind rein qualitativ und basieren auf einem Farbumschlag. Das Vorliegen von Reinkulturen und gutes Wachstum sind die Voraussetzungen zur korrekten Durchführung des Tests.

Die Mitteilung eines definitiv positiven Ergebnisses kann häufig erst nach Ablauf mehrerer Wochen erfolgen.

Erregernachweis mit dem Bactec® 460-Tb-System

Grundlage dieses Verfahrens bildet das radiometrische Nachweisverfahren von Stoffwechsel-Leistungen der Mykobakterien. Das flüssige Kulturmedium enthält radioaktiv-markierte (¹⁴C) Palmitinsäure, die von Mykobakterien abgebaut wird. Dabei entstehendes radioaktiv markiertes ¹⁴CO₂ kann im Kulturüberstand vom Bactec®-Gerät direkt quantitativ bestimmt werden. Dieser gemessene Wert ist direkt proportional zur Wachstumsgeschwindigkeit der Mykobakterien und wird als Growth Index (GI) bezeichnet. Verschiedene Studien zeigen, daß das Verfahren zur Anzüchtung von Mykobakterien aus Sputum, Bronchialsekret, Pleurapunktat und extrapulmonalen Proben nach entsprechender Vorbehandlung geeignet ist [3, 6].

DNA-Gensonden-Test

Der in der vorliegenden Arbeit angewandte DNA-Gensonden-Test zur Erreger-Identifizierung ist ein kommer-

ziell erhältlicher Kulturbestätigungstest zum Nachweis ribosomaler RNA verschiedener Mykobakterien-Subspezies mittels spezifischer DNA-Sonden (Fa. Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA; Fa. Biermann GmbH, Bad Nauheim).

Folgende DNA-Sonden-Tests wurden verwendet:

- M. tuberculosis complex (umfaßt M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. microti)
- M. avium
- M. intracellulare
- M. kansasii
- M. gordonae.

Der DNA-Sonden-Hybridisierungstest ist ein Kulturbestätigungstest, sowohl für Kolonien fester Kulturen als auch für Flüssigkulturen. Grundlage ist die Hybridisierung einer Acridiniumester-markierten einzelsträngigen DNA mit der rRNA des Zielorganismus. Zielsequenz ist die 16 S-RNA, die sehr spezifisch und konservativ im Vergleich zu enzymkodierten DNA-Abschnitten ist. Die ribosomale RNA des Mykobakteriums wird durch die Zugabe eines lysierenden Reagenz freigesetzt und bildet bei Vorhandensein komplementärer Nukleotidsequenzen mit der DNA-Sonde stabile DNA/RNA-Hybride. Anschließend erfolgt die Trennung, d. h. die selektive chemische Desintegration des Acridiniumesters der nicht-hybridisierten DNA-Sonde. Während der Acridiniumester in den hybridisierten Molekülen durch die Interkalierung im Hybrid eine Stabilisierung erfährt, zerfällt der Acridiniumester der unhybridisierten Probe in alkalischer Lösung und kann bei anschließender Messung kein Lichtsignal mehr abgeben. Während des Meßvorganges im Luminometer (PAL, Fa. Biermann) wird der Acridiniumester auf den hybridisierten Sonden durch Zugabe von H₂O₂ und NaOH zunächst aktiviert und emittiert beim nachfolgenden Zerfall Licht, das im Photomultiplier registriert und in Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/sec) angezeigt wird. Anhand eines angegebenen cut-off's kann zwischen einem positiven und negativen Ergebnis unterschieden werden.

Amplicor® M. tuberculosis complex Test (PCR)

Grundsätzlich wird über die PCR-Reaktion ein DNA-Fragment (Template) über die sequenzspezifische Hybridisierung und Elongation von zwei Oligonukleotid-Primern in exponentieller Weise amplifiziert. Das Grundprinzip dieser dreistufigen thermozyklischen Reaktion basiert auf der wiederholten Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelsträngen, der spezifischen Hybridisierung kurzer Oligonukleotide (Primer) und einer templatespezifischen Elongation dieser Primer mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Über diese Reaktionsfolge wird eine exakte Kopie des Template-Nukleinsäurebereiches zwischen den beiden Primer-Hybridisierungsstellen erzeugt. Da diese neu-

synthetisierten Elongationsprodukte jeweils zusätzliche, identische Template-Moleküle darstellen, verdoppelt sich während jedes Replikationsschrittes die Anzahl der Template-Moleküle im Reaktionsansatz [7].

Das Konzept der *AC*-Teste basiert auf einer Kombination aus PCR mit nachfolgender Nukleinsäure-Hybridisierung sowie anschließender Produktdetektion mittels Farbentstehung und ermöglicht so einen schnellen und direkten DNA-Nachweis des Erregers.

Mit dem *AC*-Test ist der Nachweis von Mykobakterien des MTC in dekontaminierten Sputum- und Bronchiallavage-Proben möglich.

Der *AC*-Test verwendet in der PCR genusspezifische Primer aus einer hochkonservierten Region der 16S ribosomalen RNA, um eine Sequenz aus 584 Basenpaaren des Mykobakterien-Genoms zu sequenzieren.

In der Hybridisierungsreaktion werden die amplifizierten rRNA-Sequenzen (Amplicone) chemisch zu Einzelsträngen denaturiert und in Mikrotiterplatten überführt, die eine amplicon-spezifische Oligonukleotidsonde in gebundener Form enthalten. Diese *M. tuberculosis complex* spezifische Sonde wurde aus der hypervariablen 16S rRNA Gen-Region des Bakteriums ausgewählt.

Nach dem Waschvorgang wird in der Detektionsreaktion Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben, welches an das biotinylierte Amplicon bindet. Als Substrate werden H_2O_2 sowie Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt.

Eine selektive Amplifikation der Ziel-DNA in den Patientenproben wird durch den Einsatz der AmpErase erreicht, welche das Enzym Uracil-N-Glycosylase enthält. Dieses Enzym erkennt und katalysiert die Destruktion Uracil-, aber nicht Thymidin-enthaltender DNA. Uracil ist in Bakterien-DNA nicht enthalten, dagegen immer in Ampliconen. Uracil wird anstelle von Thymin als eines der Desoxynukleotid-triphosphate im Reaktionsgemisch verwendet, so daß nur die Amplicone Uracil enthalten.

Gen-Probe® Mycobacterium tuberculosis complex Direkt-Test (Isotherme Amplifikation)

Der Direktnachweis von Mykobakterien des *M. tuberculosis complex* mittels isothermer Amplifikation wurde speziell für Sputum- und Bronchiallavage-Proben entwickelt, die mit N-Acetyl-L-Cystein/NaOH oder NaOH dekontaminiert wurden.

Dieser Test ist spezifisch für den *M. tuberculosis complex*, ohne allerdings zwischen den einzelnen Mykobakterien des Komplexes differenzieren zu können. Er erfaßt außer den genannten Arten des Komplexes keine anderen Mykobakterienspezies.

Das Verfahren zur Amplifizierung von Zielsequenzen nutzt die Möglichkeit der spezifischen Basenpaarung, komplementärer Oligonukleotid-Primer mit anschließender enzymatischer Amplifizierung der Ziel Nukleinsäuresequenzen. Das Amplifizierungssystem von *Gen-*

Probe® vervielfältigt spezifische rRNA über DNA-Intermediate. Der Nachweis der amplifizierten rRNA-Sequenzen erfolgt über die schon im Kulturbestätigungstest der Fa. Gen Probe eingesetzte Nukleinsäurehybridisierung mittels erprobter Acridiniumester-markierter DNA-Sonden. Die Chemilumineszenz-markierte Einzelstrang-DNA-Sonde ist komplementär dem Amplicon. Die markierte DNA-Sonde bildet mit dem Amplicon ein stabiles RNA-DNA-Hybrid. Das Selektionsreagenz differenziert zwischen hybridisierten und nicht-hybridisierten Sonden. Die markierten RNA/DNA-Hybride werden in einem Luminometer bestimmt und das Ergebnis anhand eines cut-offs als positiv oder negativ bewertet.

Um Durchführbarkeit sowie Schnelligkeit der Tests miteinander vergleichen zu können, sind die einzelnen Arbeitsschritte in Tabelle 2 aufgeführt.

Die zeitaufwendigsten Phasen während der Testdurchführung sind die Präzisions-Pipettierschritte. Während des letzten Pipettierschrittes wird das Amplifikat im *AC*-Test in ein anderes Röhrchen überführt. Dies ist der problematischste Schritt hinsichtlich einer möglichen Kontaminationsgefahr.

Besonders hervorzuheben ist, daß die eingesetzten Patienten-Materialien einer Dekontamination mit N-acetyl-L-cystein unterzogen wurden. Die Richtlinien des Herstellers wurden bei der Durchführung exakt beachtet.

Da bekannt ist, daß Blutbeimengungen in der Probe möglicherweise zu falsch positiven Ergebnissen führen, wurden lediglich diejenigen Materialien eingesetzt, bei denen eine derartige Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse der Analyse von 387 Patientenmaterialien sind im einzelnen in Tabelle 3 aufgeführt. Bei der Analyse von 238 Patientenmaterialien ergab sich kein Unterschied hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen der PCR und der isothermen Amplifikation. Sowohl mit der PCR als auch mit der isothermen Amplifikation wurde jeweils in 2 verschiedenen Sputen ein positives Ergebnis gefunden, welches weder mittels Bactec®-System, Festagarkultur, dem mikroskopischen Bild noch mit der anderen molekularbiologischen Methode bestätigt werden konnte. Aufgrund dieser Beobachtung, und aufgrund der Tatsache, daß der Einsatz der PCR in der Tuberkulosedagnostik schon in mehreren Studien [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17] untersucht wurde, entschlossen wir uns, die restlichen 149 Patientenmaterialien, auch im Hinblick auf die immer noch hohen Kosten, nur mit der isothermen Amplifikation zu analysieren. Es soll noch einmal betont werden, daß dort, wo die PCR falsch negative Ergebnisse lieferte, auch mit der isothermen Amplifikation ein falsch negatives Ergebnis zustande kam.

Tabelle 2. Vergleich der Arbeitsanleitungen des Roche *Amplicor*[®]- und des Gen Probe *Amplified*[®] Direkt-Tests

Roche <i>Amplicor</i> [®] Test	Gen Probe <i>Amplified</i> [®] Direkt Test
<p>Abschnitt 1: Reagenzienvorbereitung</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vorbereitung des Master Mix durch Pipettieren von 100 µl AmpErase in den Master Mix. Gut durchmischen. - Vorbereitung der PCR-Röhrchen einschließlich einer positiven und drei negativen Kontrollen - In jedes Röhrchen werden 50 µl des vorbereiteten Master Mix pipettiert. 	<p>Abschnitt 1: Reagenzienvorbereitung</p> <ul style="list-style-type: none"> - 750 µl des Rekonstitutionspuffers werden zu dem lyophilisierten Reagenz gegeben und gut durchmischt. - Vorbereitung der Amplifikationsröhrchen plus einer Positiv- und einer Negativkontrolle. - 25 µl des gelösten Amplifikationsreagenz in jedes Amplifikationsröhrchen pipettieren. - Zugabe von 200 µl Ölreagenz in jedes Röhrchen.
<p>Abschnitt 2: Probenvorbereitung</p> <ul style="list-style-type: none"> - 500 µl einer Waschlösung werden in 1,5 ml Gefäße pipettiert. - 100 µl des Probensediments werden in jedes dieser Röhrchen gegeben. - Für 10 Minuten bei 12 500 g zentrifugieren. - Überstand verwerfen. - 100 µl des Sputum-Lysis-Reagenz in jedes Röhrchen pipettieren, vortexen. - Proben und Kontrollen für 45 Minuten bei 60° C inkubieren. - 5 Sekunden an zentrifugieren. - 100 µl des Sputum-Neutralisierungs-Reagenz zugeben und vortexen. - 50 µl der vorbereiteten Proben und Kontrollen in die zugehörigen PCR-Röhrchen pipettieren. 	<p>Abschnitt 2: Probenvorbereitung</p> <ul style="list-style-type: none"> - 200 µl Probenverdünnungspuffer werden in jedes Lysis-Röhrchen gegeben. - 50 µl Probensediment werden in jedes Röhrchen pipettiert. - Ultraschallbehandlung der Lysisröhrchen für 15 Minuten. - 50 µl der Lysate werden in die zugehörigen Amplifikationsröhrchen gegeben. - Inkubieren der Röhrchen bei 95° C für 15 Minuten. - Auflösen des lyophilisierten Enzymreagenzes in 1,4 ml Enzymlösungspuffer.
<p>Abschnitt 3: Amplifikation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Probenhalter in Thermocycler geben und das Gerät programmieren. - Protokoll läuft ca. 1,5 Stunden - Vorsichtiges Entfernen der Verschlüsse von jedem Röhrchen (Aerosolbildung vermeiden). - 100 µl Denaturierungslösung in jedes PCR-Röhrchen geben. - 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. 	<p>Abschnitt 3: Amplifikation</p> <ul style="list-style-type: none"> - Röhrchen in einem Mindestzeitraum von 15 Minuten auf 42° C bringen. - 25 µl Enzymreagenz in jedes Röhrchen geben und zum Mischen das Rack schütteln. - Inkubation bei 42° C für 2 Stunden. - 20 µl Terminationsreagenz in jedes Röhrchen geben, anschließend kurzes Schütteln des Racks. - Inkubation bei 42° C für 10 Minuten.
<p>Abschnitt 4: Hybridisierung und Detektion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vorbereitung des Waschpuffers - Mikrotiterplatten auf Raumtemperatur bringen und 100 µl Hybridisierungspuffer zugeben. - 25 µl denaturierte Amplifizierungsprobe in die Kavitäten pipettieren, mischen. - Inkubation für 1,5 Stunden bei 37° C. - Platte 5 mal waschen, jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit der Waschlösung nach jedem Waschgang. - Zugabe von 100 µl Avidin-Meërettich-Peroxidase in jede Kavität. - 15 Minuten Inkubation bei 37° C. - 100 µl der fertigen Substratlösung werden in jede Kavität pipettiert. - 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren. - 100 µl Stop-Reagenz in jede Kavität pipettieren. - Messung im Mikrotiterplatten-Lesegerät. 	<p>Abschnitt 4: Hybridisierung und Detektion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lyophilisiertes Sondenreagenz mit 6 ml Hybridisierungspuffer aufnehmen und vortexen. - 100 µl Sondenreagenz in jedes Amplifizierungs-Röhrchen geben. - Röhrchen 3 mal 3 Sekunden in einem Multi-Tube-Vortex mischen. - Inkubation für 15 Minuten bei 60° C. - Zugabe von 300 µl Selektionsreagenz und nachfolgend kräftiges Durchmischen in einem Multi-Tube-Vortex. - 10 Minuten bei 60° C inkubieren. - 5 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen. - Messung im Luminometer.

Tabelle 3. Vergleich verschiedener Methoden in der Mykobakterien-Diagnostik. Auflistung der positiven Ergebnisse in den einzelnen Verfahren

Material	Mikroskopischer Nachweis	Isotherme Amplifikation	Bactec®-System	Festagar-nährböden	Differenzierung MT/ATM
Sputum (n = 190)	23	25	34	34	28/6
BS + BL (n = 162)	25	29	38	38	32/6
Magensaft (n = 25)	1	1	2	2	1/1
Summe (n = 387)	49	55	74	74	61/13

BS = Bronchialsekret
 BL = Bronchiallavage
 MT = M. tuberculosis
 ATM = atypische Mykobakterien

Von n = 387 Patienten-Materialien wurden mittels Kulturverfahren (Flüssig- und Festagarkultur) in n = 74 Fällen Mykobakterien nachgewiesen.
 Von diesen n = 74 positiven Mykobakterien-Nachweisen fanden sich in n = 61 Fällen M. tuberculosis und in n = 13 Fällen atypische Mykobakterien.
 Diese n = 13 atypischen Mykobakterien gliederten sich wie folgt: n = 6 M. xenopi, n = 4 M. kansasii und n = 3 M. gordonae.

Sowohl mit dem *AC*- als auch mit dem *AF*-Test gelingt der Nachweis von Mykobakterien des *M. tuberculosis* complex, ohne allerdings zwischen einzelnen Mykobakterien dieses Komplexes unterscheiden zu können. Atypische Mykobakterien können also mit keiner der beiden molekularbiologischen Teste nachgewiesen werden. Bei atypischen Mykobakterien ist also eine Kultur mit nachfolgender Erregeridentifizierung mittels Gensonde oder konventioneller biochemischer Methoden weiterhin zwingend notwendig. Der *AF*- und der *AC*-Test konnten in der vorliegenden Untersuchung sicher zwischen den atypischen Mykobakterien und dem *M. tuberculosis* unterscheiden.

Betrachtet man die Ergebnisse aus Tabelle 3 im einzelnen, so konnten bei der Analyse von n = 387 unterschiedlichen Materialien bei n = 286 Patienten in 74 Fällen mit den Kulturverfahren (Flüssig- und Festagarkultur) Mykobakterien nachgewiesen werden. Von den genannten n = 74 Fällen, in denen Mykobakterien nachgewiesen wurden, handelte es sich in n = 61 Materialien um *M. tuberculosis* und in n = 13 Fällen um atypische Mykobakterien. Diese gliederten sich wie folgt:

n = 6 M. xenopi
 n = 4 M. kansasii
 n = 3 M. gordonae

Von den n = 61 positiven *M. tuberculosis*-Nachweisen in der Kultur als „*Golden Standard*“, konnten mithilfe der isothermen Amplifikation n = 55 direkt aus dem Patienten-

material richtig detektiert werden. Daraus ergibt sich für diese molekularbiologische Methode eine Sensitivität von 90 %. Neben den n = 6 falsch negativen Resultaten der isothermen Amplifikation sind auch n = 2 falsch positive Ergebnisse von Sputum-Analysen zu verzeichnen. In diesen beiden Sputum-Proben ließen sich weder mikroskopisch noch unter Zuhilfenahme der Kulturverfahren Mykobakterien nachweisen. Auch die ausführliche klinische Anamnese lieferte keinen Hinweis auf eine akute bzw. stattgehabte Tbc.

Rechnerisch ergibt sich für die isotherme Amplifikation eine Spezifität von ≥ 99 %.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, lag die Sensitivität des mikroskopischen Nachweises für alle Mykobakterien bei 66 % (49/74).

Betrachtet man die Ergebnisse der PCR, so wurden von n = 238 Materialien 38 Fälle mit kulturell positivem Mykobakterien-Nachweis ermittelt. In 33 der 38 positiven Mykobakterien-Befunde lag *M. tuberculosis* vor. Von diesen n = 33 *M. tuberculosis*-Fällen konnten sowohl mithilfe der PCR als auch mittels der isothermen Amplifikation n = 30 direkt aus dem Patientenmaterial richtig detektiert werden. Damit ergibt sich eine Sensitivität der PCR-Methode von 91 %.

Neben den n = 3 falsch negativen Resultaten der PCR sind wiederum n = 2 falsch positive Ergebnisse von Sputumanalysen aufgetreten. Auch in diesen Sputen ließen sich weder anamnestisch, mikroskopisch noch kulturell Hinweise auf das Vorliegen einer Mykobakterien-Infektion gewinnen.

Rechnerisch ergibt sich auch für die PCR-Methode eine Spezifität von ≥ 99 %.

Bei beiden molekularbiologischen Methoden werden im Kit enthaltene Kontrollen für die Amplifikation und Hybridisierung mitgeführt.

Der *AF*-Test verwandte eine positive und negative Amplifikationskontrolle sowie eine positive und negative Hybridisierungskontrolle:

Positive isotherme Amplifikationskontrolle cut-off > 500 000 RLU

Negative isotherme Amplifikationskontrolle cut-off < 20 000 RLU

Positive Hybridisierungskontrolle cut-off > 20 000 RLU

Negative Hybridisierungskontrolle cut-off < 5 000 RLU

Beim *AC*-Test wurden eine Positiv- und drei Negativkontrollen eingesetzt:

Positive Kontrolle cut-off > 3.0 OD

Negative Kontrolle cut-off < 0.25 OD

Zur Analyse des Patientenmaterials wurden insgesamt 24 isotherme Amplifikations- und 26 PCR-Läufe durchgeführt.

Bei den 24 isothermen Amplifikationen lag eine positive Amplifikationskontrolle mit 476 387 RLU sowie eine

positive Hybridisierungskontrolle mit 18 940 RLU unterhalb des zulässigen cut-off. Alle anderen Amplifikations- und Hybridisierungs-Kontrollen bewegten sich innerhalb des von der Herstellerfirma deklarierten Bereichs.

Bei 16 PCR-Läufen lag eine negative Kontrolle mit einem OD-Wert von 0,271 zu hoch. Alle anderen Kontrollen befanden sich in dem vom Hersteller deklarierten Bereich.

In Tabelle 4 sind Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Kontrollen, die im deklarierten Bereich lagen, angegeben.

Insgesamt sind die Ergebnisse der Kontrollen, sowohl bei den PCR- als auch bei den isothermen Amplifikationsläufen, zufriedenstellend, so daß nur wenige Läufe beim routinemäßigen Einsatz dieser molekularbiologischen Methoden wiederholt werden mußten.

Bezüglich der Analyse des Patientenmaterials lag der cut-off für ein positives Ergebnis in der isothermen Amplifikation bei > 30 000 RLU, in der PCR bei > 0,35 OD.

Bei der Betrachtung der positiven Ergebnisse des Patientenmaterials ist zu vermerken, daß sich der niedrigste RLU-Wert bei 853 290 befand. Alle anderen positiven Ergebnisse wiesen RLU-Werte > 1 500 000 auf.

Der niedrigste OD-Wert bei positiven Ergebnissen aus Patientenmaterial lag bei 0,699. Alle anderen positiven Ergebnisse lagen oberhalb einer OD von 0,8.

97 % der negativen Ergebnisse wiesen RLU-Werte von < 10 000 auf, und 89 % hatten RLU-Werte von < 5000 bei der isothermen Amplifikation. Der höchste RLU-Wert bei negativem Patientenmaterial war 14 752.

Bei der PCR lagen 95 % der negativen Patientenproben unterhalb einer OD von 0,1. Die höchste negative Patientenprobe wies eine OD von 0,132 auf.

Zusammenfassend zeigten beide molekularbiologischen Verfahren eine sehr gute Diskriminationsfähigkeit zwischen positiven und negativen Resultaten.

In der vorliegenden Untersuchung wurden auch die Sputen aus Teil 2 und 3 des Mykobakterien-Ringversuchs Ende 1994 mit dem *AF*- und dem *AC*-Test untersucht. Wie bereits oben erwähnt gelang mit beiden Testsystemen die sichere Detektion von *M. tuberculosis*, während die atypischen Mykobakterien sicher nicht detektiert wurden.

Diskussion

Mit dem neuen *AF*-Test steht eine alternative molekularbiologische Untersuchungsmethode für die Tuberkulose-Diagnostik zur Verfügung, die auf der isothermen Amplifikation von rRNA-Sequenzen basiert.

Das Verfahren bietet einige Vorteile gegenüber dem Einsatz der konventionellen PCR-Analytik:

1. Der Gen-Probe Test detektiert rRNA, die in einer Anzahl von ca. 2000 Kopien pro Zelle vorliegt. Damit kann theoretisch die Sensitivität des Assays gegenüber anderen Verfahren, die Zielsequenzen mit einer wesentlich niedrigeren Kopienzahl pro Zelle erkennen, erhöht werden. Überdies nimmt damit auch die Wahrscheinlichkeit einer Amplifikationsmöglichkeit zu.
2. Der Test kann ähnlich wie die Roche-PCR zum Direktnachweis aus Patientenmaterial ohne vorausgehende aufwendige Nukleinsäure-Aufreinigung eingesetzt werden. Der Detektionsschritt ist ein Hybridisierungsvorgang mit einer sensitiven, Acridiniumester-markierten Gensonde, welche spezifisch für den *M. tuberculosis complex* ist. 124 andere Bakterienarten reagieren nicht mit dieser Gensonde [18]. Die routinemäßige Einsatzfähigkeit der Acridiniumester-markierten Gensonde wird bisher bereits im Kultur-Bestätigungstest der Fa. Gen-Probe unter Beweis gestellt.
3. Alle Schritte von der Amplifikation bis zur Detektion werden in nur einem Röhrchen durchgeführt. Damit wird die Gefahr der Kontamination deutlich reduziert; zudem ist der Test auch einfach in der Handhabung.
4. Das RNA-Produkt, welches als Folge der Amplifikation entsteht, ist theoretisch außerhalb des Reaktionsgefäßes labiler als das DNA-Produkt, welches bei anderen molekularbiologischen Verfahren erzeugt wird. Damit ist die Gefahr einer Kontamination durch im Labor befindliches anderes Nukleinsäure-Material geringer als bei der PCR, so daß die Zahl falsch positiver Ergebnisse geringer sein sollte.

Tabelle 4. Mittelwerte und Standardabweichungen der packungsinternen Kontrollen des *Amplified*[®] und des *Amplicolor*[®] Tests

Kontrollen	Mittelwert	Standardabweichung
Positive Amplifikationskontrolle (N = 23)	2 235 749 RLU	365 621 RLU
Negative Amplifikationskontrolle (N = 24)	3 201 RLU	469 RLU
Positive Hybridisierungskontrolle (N = 23)	28 343 RLU	5 973 RLU
Negative Hybridisierungskontrolle (N = 24)	1 027 RLU	127 RLU
Positive PCR-Kontrolle (N = 16)	> 3,0 O.D.*	*
Negative PCR-Kontrolle (N = 15)	0,083 O.D.	0,011 O.D.

RLU = Relative Lichteinheiten

O.D. = optische Dichte

* = Mit dem in den Untersuchungen verwendeten Photometer war eine Linearität nur bis zu einer optischen Dichte von 3,0 gegeben, so daß hier keine exakten Daten hinsichtlich Standardabweichung und Mittelwert angegeben werden können.

Insgesamt wurden n = 24 Amplifikationsläufe und n = 16 PCR-Läufe durchgeführt.

Sowohl mit Hilfe der isothermen Amplifikation als auch mit der PCR kann der Nachweis von *M. tuberculosis* aus Patientenmaterial innerhalb eines Tages durchgeführt werden. Dies bedeutet eine erhebliche Zeitersparnis gegenüber allen herkömmlichen Methoden.

Trotz dieser Zeitersparnis wird der routinemäßige Einsatz molekularbiologischer Methoden in der Tuberkulose-Diagnostik kontrovers diskutiert [1, 2, 4, 5, 19], zumal beide Verfahren zur Zeit relativ teuer und arbeitsaufwendig sind.

Angesichts der Konsequenzen der Diagnose „Tuberkulose“ für die betroffenen Patienten ist die Frage nach der Spezifität einer Methode von ganz besonderer Bedeutung. Das Risiko eines falsch positiven Befundes sollte so gering wie eben möglich sein. Da bekanntlich 10–100mal mehr Menschen mit Mykobakterien infiziert werden als tatsächlich an einer manifesten Tuberkulose erkranken, ist ein großes Reservoir für potentiell falsch positive Resultate einer hochempfindlichen Methode gegeben. Daraus stellt sich für Mauch [2] die Frage, bis zu welcher Grenze der Nachweis von Mykobakterien-DNA-Bruchstücken als falsch positiv anzusehen ist. In zahlreichen Publikationen wird auf das Problem falsch positiver Resultate hingewiesen [10, 20, 21]. Dabei ist meist nicht geklärt, ob es sich bei diesen falsch positiven Ergebnissen um methodisch oder klinisch-diagnostisch falsch positive Ergebnisse handelt. In vielen Studien sind die einzelnen Testgruppen zudem recht klein [12, 14, 22].

Bezüglich falsch positiver Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß sowohl die isotherme Amplifikation als auch die PCR Nukleinsäure-Fragmente nicht kultivierbarer Mykobakterien detektieren können. Wird als „Goldener Standard“ die Kulturmethode (Flüssigkultur oder Festagar) zum Vergleich hinzugezogen, so muß das Ergebnis „falsch positiv“ kritisch hinterfragt werden. Unbedingt sollte eine präzise Analyse der Anamnese und anderer Labordaten zur Verifizierung des Ergebnisses herangezogen werden.

Sehr interessant ist eine kürzlich publizierte Studie über die Validität und Reproduzierbarkeit der PCR bei der Detektion von *M. tuberculosis* in klinischen Materialien [23]. An einem externen Ringversuch nahmen 7 internationale Referenzlaboratorien teil. Der Prozentsatz falsch positiver Befunde der PCR lag zwischen 3 und 77, die der falsch negativen bei einer Konzentration von 10^3 Mykobakterien zwischen 0 und 90 %. Bei einer Konzentration von 10^4 Mykobakterien wurden die Mykobakterien mittels PCR in 5 von 7 Laboratorien nur zu 20 bis 90 % erkannt [23]. Dies läßt die Schwierigkeiten molekularbiologischer Techniken beim Routineeinsatz erahnen. Die Möglichkeit falsch positiver Reaktionsergebnisse aufgrund von Kontaminationen (kontaminierende Nukleinsäuren aus Luftaerosolen, Pipetten-Totvolumina etc.) zwingt die mit diesen Methoden arbeitenden Laboratorien, aufwendige Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Zusätzlich erschwerend war in der Vergangenheit die Tatsache, daß die auf dem Markt erhältlichen Prä-

parate der Taq-DNS-Polymerase häufig mit bakterieller DNS verunreinigt waren [24, 25].

In den meisten Studien wird die Sensitivität der molekularbiologischen Methoden in der Mykobakterien-Diagnostik als gut beschrieben. Die meisten mikroskopisch und kulturell positiven Befunde sind auch in der PCR positiv. Berichtet wird allerdings über Probleme mit Inhibitoren der PCR-Reaktion in Sputen und anderen Probenmaterialien. Vereinzelt wurde auch von PCR-Ergebnissen berichtet, deren Sensitivität schlechter war als im Kulturverfahren. Dies könnte von der Wahl der Primer bzw. Sonden und auch von der DNA-Isolierungs- und Reinigungstechnik abhängen.

Die bisher publizierten und unsere eigenen erhobenen Daten zum *AF*-Test sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Sensitivität der isothermen Amplifikation (*Amplified*[®] Test) in bisher veröffentlichten sowie eigenen Untersuchungen

Literatur	Sensitivität	Spezifität
Pfyffer et al. (1994) [26]	97,2 %	96,1 %
Jonas et al. (1993) [18]	79,8 %	96,7 %
Abe et al. (1993) [27]	91,9 %	100 %
Miller et al. (1994) [28]	91 %	98,5 %
Eigene Daten (1995)	90 %	≥ 99 %

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die *klinische Sensitivität* eines Testes von 4 Hauptfaktoren abhängt:

- der analytischen Sensitivität,
- der Sensitivität der Standardmethode (in diesem Fall der Kultur-Technik),
- der Verteilung der Positivproben (Verteilung von schwach positiv zu deutlich positiv) und
- dem Einfluß der Probenheterogenität (insbesondere bei schwach positiven Proben).

Daher ist es verständlich, daß in unterschiedlichen Laboratorien verschiedene Sensitivitäten für diesen kommerziell erhältlichen Test gefunden werden.

Die falsch negativen Ergebnisse in unserer Untersuchung könnten z. B. folgendermaßen erklärt werden:

- Vorhandensein möglicher Inhibitoren der Amplifikation in der Probe (analog zu den beschriebenen Inhibitoren der PCR-Reaktion) sowie
- nicht einheitliche Verteilung der Mikroorganismen im Patientenmaterial.

Mit dem neuen *AF*-Test steht eine interessante Alternative zur konventionellen PCR zur Verfügung. Sensitivität und Spezifität der *AC*-PCR und der *AF*- isothermen Amplifikation sind in unserer Untersuchung mit ca. 90 %

bzw. $\geq 99\%$ vergleichbar gewesen. Es handelt sich dabei aber nur um vorläufige Ergebnisse, die noch an einem größeren Studienkollektiv weiter evaluiert werden sollten.

Der *AF*-Test bietet einige theoretische Vorteile gegenüber dem *AC*-Test. Desweiteren ist besonders hervorzuheben, daß beim *AF*-Assay alle Testschritte von der Amplifikation bis zur Detektion in nur einem Röhrchen durchgeführt werden. Damit wird die Gefahr einer Kontamination und falsch positiver Resultate verringert. Desweiteren ist dieser Test einfach durchzuführen.

Bei der Betrachtung der RLU- und OD-Werte von positiven und negativen Testergebnissen aus Patientenmaterial wird die gute Diskriminationsfähigkeit der beiden Tests deutlich. Die Werte der Kontrollen beider Tests lagen in der Regel im deklarierten Bereich, so daß nur selten eine Testwiederholung aufgrund fehlerhafter Kontrollen notwendig war.

Beim Einsatz von Ringversuchsproben konnten beide Tests *M. tuberculosis* sicher detektieren, während die atypischen Mykobakterien zuverlässig nicht detektiert wurden.

Wie bereits ausgeführt, gelingt sowohl mit dem *AC*- als auch mit dem *AF*-Test der Nachweis von Mykobakterien aus dem *M. tuberculosis* complex, ohne allerdings zwischen diesen Mykobakterien unterscheiden zu können. Atypische Mykobakterien werden also mit keiner der beiden molekularbiologischen Tests nachgewiesen. Bei atypischen Mykobakterien ist demzufolge eine Kultur mit nachfolgender Erreger-Identifizierung mittels Gensonde oder konventioneller biochemischer Methoden weiterhin erforderlich. Sowohl der *AF*- als auch der *AC*-Test konnten in der vorliegenden Untersuchung sicher zwischen den atypischen Mykobakterien und *M. tuberculosis* differenzieren.

Der Einsatz molekularbiologischer Verfahren in der Tuberkulosedagnostik dürfte in Zukunft insbesondere bei der Untersuchung folgender Probenmaterialien von Bedeutung sein:

- Liquor bei Verdacht auf tuberkulöse-Meningitis,
- Pleurapunktate bei Verdacht auf Tuberkulose,
- Biopsien extrapulmonaler Herde zum Ausschluß einer Tuberkulose sowie
- Sputum von Patienten mit hochgradigem Tuberkuloseverdacht und
- Material immunsupprimierter Patienten (z. B. AIDS) mit V. a. Tbc.

In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß die Bearbeitung von Liquorproben mit beiden molekularbiologischen Verfahren Schwierigkeiten bereitet. Hier gilt es in der Zukunft, noch ein Untersuchungsprotokoll zu entwickeln, das eine valide Analyse solcher Liquorproben und eine eindeutige Befundung ermöglicht.

Ein positives Resultat mit einer der molekularbiologischen Nachweismethoden erlaubt allenfalls die Mitteilung einer Verdachtsdiagnose, sofern entsprechende

klinische Hinweise bestehen. Eine Tuberkulose sollte erst bei zusätzlichen positiven Kulturbefunden und in Zusammenhang mit entsprechenden klinischen Befunden als gesichert angesehen werden. Eine Mykobakterienkultur wird auch in näherer Zukunft notwendig sein, zum einen zur genauen Resistenztestung, zum anderen, weil nur die Kultur die Vermehrungsfähigkeit der Mykobakterien nachweist.

Korrespondenz-Adresse:

Dr. med. F.-J. Schmitz
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. U. Hadding), Geb. 22. 21,
Moorenstraße 5, D-40225 Düsseldorf

Literatur

1. Bitter-Suermann D (1993) Der Stellenwert der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die klinische Diagnostik von Infektionskrankheiten. Dtsch Arztebl 90, B 2386-B2389
2. Mauch H (1994) Die Polymerase-Kettenreaktion in der Tuberkulose-Diagnostik. mta 9, 356-361
3. Oswald F, Focht J, Trobisch H (1993) Tuberkulose-Diagnostik im mikrobiologischen Routine-Labor. Lab med 17, 165-172
4. Seelig R, Renz M, Bottner C, Stockinger K, Czichos J, Schulz V, Seelig HP (1991) Tuberkulose-Schnelldiagnostik mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Immun Infekt 19, 179-185
5. Tintelnot K, Kirchner P, Schmidt M, Böttger EC, Hesemann J (1992) Schnelligkeit versus Zuverlässigkeit. Eine kritische Analyse der Schnelldiagnostik von Mykobakteriosen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Immun Infekt 20, 56-59
6. DeWit D, Maartens G, Steyn L (1992) A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculosis pleural effusions. Tuberc Lung Dis 73, 262-267
7. Reischl U, Mayer J (1993) Moderne Methoden in der Nucleinsäure-Diagnostik. Lab med 17, 456-464
8. Brisson-Noel A, Lecossier D, Nassif X, Gicquel B, Levy-Frebault V, Hance AJ (1989) Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 305, 1069-1071
9. Brisson-Noel A, Nguyen S, Bonete R, Aznar C, Pierre C, Pialoux G, Garrigue G, Chureau C, Bartoli M, Gicquel B (1991) Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet 338, 364-366
10. Cousins D, Wilton SD, Francois BR, Gow BL (1992) Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 30, 255-258
11. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT (1990) Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *M. tuberculosis*. J Inf Dis 161, 977-981
12. Eisenach KD, Siffo MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT (1991) Detection of *M. tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis 144, 1160-1163

13. Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebauld V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, Giquel B (1989) Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol* 3, 843-849
14. Lassence A, Lecossier D, Pierre C, Cadranel J, Stern M, Hance HJ (1992) Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction: Comparison of two protocols. *Thorax* 47, 265-269
15. Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhargava A, Saluja S, Shrinivas MB (1991) Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 72, 21-27
16. Nolte FS, Metchok B, Shainnien T (1993) Direct detection of *M. tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridisation. *J Clin Microbiol* 31, 1777-1782
17. Pao CC, Jen TSB, Jou JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH (1990) Detection and identification of *M. tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 28, 1877-1880
18. Jonas V, Alden M, Curry JJ, Kamisango K, Knott C, Langfort R, Wolfe JM, Moore DF (1993) Detection and identification of *M. tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 31, 2410-2416
19. Böttger EC (1991) Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern - die Familie Mycobacteriaceae. *Immun Infekt* 19, 143-152
20. Pierre C, Lecossier D, Boussougant J, Bocart D, Joly V, Yeni P, Hance AJ (1990) Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *M. tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 29, 712-717
21. Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Shrinivas MB, Ahuja GK (1991) Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 337, 5-7
22. Hermans PWM, Hartskerl RA, Tole JER, Klatser PR (1990) Development of diagnostic tests for leprosy and tuberculosis. *Trop Med Parasitol* 41, 301-303
23. Nordhoek GT, Kolk AHJ, Godfrey P (1994) Sensitivity and specificity of PCR for detection of *M. tuberculosis*: A blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 32, 277-284
24. Böttger EC (1990) Frequent contamination of Taq-polymerase with DNA. *Clin Chem* 36, 1258-1262
25. Böttger EC (1992) PCR für die Identifizierung von Mykobakterien. *Klin Lab* 38, 333-334
26. Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, Weber R (1994) Direct detection of *M. tuberculosis* complex in respiratory specimen by a target amplified test system. *J Clin Microbiol* 32, 918-932
27. Abe C, Hirano K, Wada M, Kazumi J, Takahashi M, Fukasawa J, Jushimura T, Miyagi C, Goto S (1993) Detection of *M. tuberculosis* in clinical specimen by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *M. Tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 31, 3270-3274
28. Miller N, Hernandez SG, Cleary T (1994) Evaluation of Gen-Probe Amplified *M. Tuberculosis* Direct Test and PCR for direct detection of *M. tuberculosis* in clinical specimen. *J Clin Microbiol* 32, 393-397