

原 著

塗抹陰性肺結核の診断における核酸増幅法検査の限界

¹伊藤 邦彦 ¹吉山 崇 ²中園 智昭 ²尾形 英雄
¹和田 雅子 ²水谷 清二

¹結核予防会結核研究所疫学研究部, ²結核予防会複十字病院呼吸器科

LIMITS OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TESTS FOR DIAGNOSIS OF SMEAR NEGATIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

¹*Kunihiko ITO, ¹Takashi YOSHIYAMA, ²Tomoaki NAKAZONO
²Hideo OGATA, ¹Masako WADA, and ²Seiji MIZUTANI

¹*Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-tuberculosis Association,
²Fukujuji Hospital, Japan Anti-tuberculosis Association

Study objectives: To assess the usefulness of commercial kits of nucleic acid amplification test (NAAT) for diagnosis of smear negative (SN) pulmonary tuberculosis.

Design and patients: Retrospective study of patients who were diagnosed as, or suspected of pulmonary tuberculosis during 3 years from January 1996 to December 1998 in Fukujuji Hospital which has 100 beds for tuberculosis patients.

Measurements and Results: 145 smear-negative culture-positive pulmonary tuberculosis patients are entered to our analysis. The DNA-based amplification test kit (Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test (AMPL), Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland) detected 39.2% (20/51, 95% confidence interval (CI): 25.8–52.6%) of smear-negative culture-positive (SNCP) pulmonary tuberculosis cases. The RNA-based amplification test kit (Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (AMTDT), Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., USA) detected 40.5% (15/37, 95% CI: 24.7–56.3%) of SNCP pulmonary tuberculosis cases. For both NAATs (AMPL and AMTDT), between two groups with and without the NAAT at diagnosis of SNCP pulmonary tuberculosis, there was statistical difference in culture-positive rate (proportion of positivity in sputum culture tests at diagnosis), but no statistical difference in maximum number of colony of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). When stratified for the culture-positive rate, adjusted sensitivity for SNCP patients was 44.2% (AMPL) and 40.4% (AMTDT) respectively. On the other hand, among 245 patients with sputum AMPL positive results during the 3 years, 8 were smear-negative culture-negative (SNCN), only one out of these 8 cases was judged as true active tuberculosis without treatment. Among 89 patients with sputum AMTDT positive results, 7 were SNCN, and 3 out of them were judged as true

*〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

* 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.

(Received 3 Aug. 2000/Accepted 21 Sep. 2000)

active tuberculosis without treatment.

Conclusion: Usefulness of commercial NAAT kits (AMPL and AMTDT) to diagnosis SN pulmonary tuberculosis is limited in the point of sensitivity.

Key words: Nucleic acid amplification test, Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test, Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test, Smear negative, Pulmonary tuberculosis, Pseudo-positive

キーワード: 核酸増幅法検査, アンプリコア, ダイレクト TB, 塗抹陰性, 肺結核, 偽陽性

背景と目的

結核の確定診断は結核菌の検出によるのが基本である。従来日本での臨床における結核菌検出のための検査はほとんどの場合、塗抹検査および小川培地での培養検査に限られていた。塗抹検査は安価で迅速性に優れるものの感度の点では満足のものではなく¹⁾、また結核菌であることの確認には培養検査を経た同定検査が必要とされる。培養検査は感度の点では塗抹検査に優るものの、従来日本で繁用されてきた前処理および小川培地による培養では陽性判定までに3週から8週を要し迅速性の面で満足のものではなく、また培養陽性の場合にも結核菌であることの確認のためにやはり同定検査を必要とする。

無論これら従来の検査は戦後日本の結核対策において重要な役割を担ってきた。しかし最近の新規結核患者数減少速度の鈍化や逆転、集団感染や院内感染事例が人々の耳目を集めている状況の中では、より迅速で感度の良い結核菌検査が求められている。このような状況の中で近年臨床の場に広く登場してきたのが核酸増幅法検査である²⁾³⁾。

核酸増幅法は結核菌に特異的な遺伝子配列を直接検出する検査でありこの際培養検査での菌増殖を経由せず遺伝子のみを直接増やす(増幅する)。このため核酸増幅法検査は数時間以内に結果を知ることができ、また直接結核菌の検出を行うため同定検査も不要で、迅速性に優れる検査である。また感度の点でも実験室レベルの検討では僅か1個以下の結核菌でも検出可能との報告⁴⁾もあり、感度の点においても優れているとされている^{5)~9)}。これらの核酸増幅法は市販の検査キットとしていくつかの種類が発売されており、日本においては現在 DNA ベースの核酸増幅法検査である Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test (Roche Diagnostic Systems 社 [Basel, Switzerland] / 以下 AMPL) および RNA ベースの Gen-Probe Amplified Myco-

bacterium Tuberculosis Direct Test (Gen-Probe 社 [San Diego, Calif., USA] / 以下 AMTDT) の2種類のキットが利用可能である。これらのテストは、実験室レベルでの検討結果を基にして、一般臨床家の間で非常に鋭敏なテストであると考えられる傾向にある。しかし結核菌培養陽性臨床検体における陽性率は一般に40~70%前後²⁾³⁾とされており、感度の点でそれほど鋭敏ではない可能性が指摘されている。また実際の臨床の現場では核酸増幅法に提出する検体の培養検査の結果は判明していないのが普通であり、塗抹陰性の結核患者において核酸増幅法検査を施行した場合の有用性の検討はあまりなされていない。

以上から、本稿は、塗抹陰性の肺結核患者における市販検査キットでの核酸増幅法検査の有用性を検討し、臨床におけるその適切な使用に資することを目的とした。

対象と方法

塗抹陰性肺結核の定義は化学療法開始から2週間以前のすべての喀痰塗抹検査が陰性のものとした。培養検査陰性/陽性の定義も同時期の検査によるものとする。調査は以下の2つの Retrospective study とし AMPL および AMTDT に分けて行った;

A) 1996年1月から1998年12月までの3年間に結核予防会複十字病院(以下、当院)で喀痰塗抹陰性培養陽性肺結核と診断された患者のうち、診断時の核酸増幅法検査の陽性率を調査する。すべての患者に核酸増幅法検査が行われているわけではないため、核酸増幅法の陽性率に影響を与えると思われる最大培養コロニー数および培養陽性率(=化学療法開始2週間以前に行われた喀痰検査における培養陽性喀痰検体数/同時期に行われた喀痰培養検査回数)について階層化して検討する。

B) 1996年1月から1998年12月までの3年間に結核予防会複十字病院で喀痰の核酸増幅法検査陽性であった患者の臨床情報を収集し、喀痰塗抹陰性培養陰性結核における核酸増幅法陽性の臨床的意義を調査する。

統 計

半定量的データの比較は Mann-Whitney U test (Significance level 5%) によった。核酸増幅法陽性率の比較は Chi-square test (Significance level 5%) によった。

結核菌検査

塗抹検査は直接塗抹で行い、Ziehl-Neelsen 法で染色した。鏡検は熟練した技師によって行われた。培養は 4% NaOH で前処理した後 2% 小川変法培地で行われ、8 週間観察とした。同定検査は Accu probe (Gen-Probe 社/前出) にて行われた。

核酸増幅法検査は、通常塗抹培養検査に出された検体

とは別個に採取され、4℃で保管し検査会社 (SRL ハ王子ラボラトリー、東京) に外注された。SRL では、キャリアオーバー等によるコンタミネーションを防ぐための空気流調整が行われている特別な検査室で、各キットの使用説明に沿った検査が行われた。報告は通常検体提出から 5~7 日で行われた。当院では、各患者での核酸増幅法検査施行の有無は主治医 (呼吸器専門医) にまかされているが、画像等から菌量の少ないと予想される患者に多く行われる傾向にある。また原則的に診断以外には核酸増幅法は用いられておらず治療のモニタリングには使用されていない。なお、同一患者で同一種類の核酸増幅法検査が行われている場合には最初に提出された検査のみを分析の対象とした。

Table 1a AMPL positive rate among SNCP cases

		Total No. of patients	AMPL was done (A)	AMPL positive (% of (A))	95% CI
	total	145	51	20 (39.2%)	25.8-52.6%
Culture positive rate (R)	$R \leq 0.34$	38	17	5 (29.4)	9.7-56.0
	$0.34 < R \leq 0.67$	53	22	7 (31.8)	12.3-51.3
	$0.67 < R$	54	12	8 (66.7)	40.0-93.4
Maximum number of cultured colony (C)	$C < 30$	79	29	11 (38.0)	20.3-55.7
	$30 \leq C$	49	18	7 (38.9)	16.4-61.4
	Uncountable *	17	4	2 (50.0)	6.8-93.2

* Less than 200 colonies, but each colony was too small to count accurately.

Abbreviation: AMPL = Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test, SNCP = smear-negative culture-positive

Table 1b AMTDT positive rate among SNCP cases

		Total No. of patients	AMTDT was done (B)	AMTDT positive (% of (B))	95% CI
	total	145	37	15 (40.5%)	24.7-56.3%
Culture positive rate (R)	$R \leq 0.34$	38	13	3 (23.1)	5.0-53.8
	$0.34 < R \leq 0.67$	53	10	2 (20.0)	2.5-55.6
	$0.67 < R$	54	14	10 (71.4)	47.7-95.1
Maximum number of cultured colony (C)	$C < 30$	79	18	5 (27.8)	9.6-53.5
	$30 \leq C$	49	12	7 (58.3)	30.4-86.2
	Uncountable *	17	7	3 (42.9)	9.9-81.6

* Less than 200 colonies, but each colony was too small to count accurately.

Abbreviation: AMTDT = Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test, SNCP = smear-negative culture-positive

結 果

A. 塗抹陰性培養陽性肺結核患者における核酸増幅法陽性率

結核菌検査台帳の調査から、結核菌培養陽性者のうち塗抹陰性患者は271人であった。これらの患者すべてのカルテおよび胸部レントゲン等を調査した結果、このうち肺外結核患者が37人、培養偽陽性もしくは臨床診断未確認の患者14人、化学療法終了後の再発とは見なされないいわゆる Isolated positive culture の患者1人、多剤耐性結核による慢性排菌患者20人、前医で塗抹陽性であった患者43人、当院転院時すでに2週間以上化学療法が施行されている患者11人を排除し残り145人の塗抹陰性培養陽性肺結核患者を以下の調査の対象とした。

結果の要約を Table 1a および 1b に示す。表中 R は培養陽性率 (= 化学療法開始2週間以前に行われた喀痰検査における培養陽性喀痰検体数/同時期に行われた喀痰培養検査回数) を示し、C は培養陽性検体中の最大コロニー数を示す。R は標準的な3連痰を想定して3つに階層化し、C は便宜的に30個を境にして2つに階層化した。

145人の喀痰塗抹培養検査回数は平均3.01 (range 1~9) であった。AMPL は51人に、AMTDT は37人に施行されていた。どちらの核酸増幅法検査においても、核酸増幅法検査施行群と非施行群では後者で有意に R が高かった (Mann-Whitney U test, AMPL で Z_0

$= 3.27$, $P < 0.001$ 。AMTDT で $Z_0 = 3.40$, $P < 0.001$)。C については有為な差はなかった (Mann-Whitney U test, AMPL で $Z_0 = 0.197$, $P = 0.84$ 。AMTDT で $Z_0 = 0.942$, $P = 0.92$ 。なおこの際、コロニー数がカウント不能なものは分析の対象外とした)。

塗抹陰性培養陽性肺結核患者における核酸増幅法検査の陽性率は AMPL で 39.2% ($= 20/51$, 95% confidence interval (CI): 25.8~52.6%), AMTDT で 40.5% ($= 15/37$, 95% CI: 24.7~56.3%) であった。R の階層別に見た場合、どちらの核酸増幅法検査においても $R > 0.67$ 以上の群では、 $0.34 < R \leq 0.67$ の群および $R \leq 0.34$ の群よりも有意に核酸増幅法陽性率が高かったが (Chi-square test, $P < 0.05$)、後の2群間では差がなかった (Chi-square test, AMPL で $P = 0.87$, AMTDT で $P = 0.86$)。C について見ると、どちらの核酸増幅法検査においても、 $C < 30$ の群と $30 \leq C$ の群では核酸増幅法陽性率に差はなかった (Chi-square test, AMPL で $P = 0.95$, AMTDT で $P = 0.09$, また群を二分する境界を10, 20, 40にしてもCの値が高い群が核酸増幅法検査の陽性率が有意に高いという結果は出なかった)。以上から R について階層化し全145人の患者に外挿して計算した場合の塗抹陰性培養陽性肺結核患者における核酸増幅法陽性率は AMPL で 44.2% [$= (38 \times 0.294 + 53 \times 0.318 + 54 \times 0.667) / 145$], AMTDT で 40.0% [$= (79 \times 0.380 + 49 \times 0.389 + 17 \times 0.500) / 145$] であった。

Table 2 Result of analysis of NAAT positive cases

	AMPL	AMTDT
No. of NAAT positive patients (A)	245	89
Among (A)		
Smear and culture (MTB) positive	198 (80.8%)	68 (76.4%)
Culture (MTB) only positive	34 (13.9)	14 (15.7)
Smear-positive culture-negative	5* (2.0)	
Smear-negative culture-negative (B)	8 (3.3)	7 (7.9)
Among (B)		
Under anti-MTB treatment	3 (37.5%)	3 (42.9%)
Within 1 year after anti-MTB treatment without clinical relapse	1 (12.5)	
True active pulmonary tuberculosis without treatment	1 (12.5)	3 (42.9)
False positive of NAAT	3 (37.5)	
Unknown		1 (14.2)

* 2 cases: Culture unknown, but clinically active tuberculosis. 2 cases: Under anti-MTB chemotherapy.

1 case: Within 1 year after completion of anti-MTB chemotherapy without clinical relapse.

Abbreviation: AMPL=Amplified Mycobacterium Tuberculosis Test, AMTDT=Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test, NAAT=Nucleic acid amplification test, MTB=Mycobacterium tuberculosis

Table 3 Sensitivity of AMPL and AMTDT for smear-negative culture-positive specimens in previous reports

Reference No.	AMPL	AMTDT
3	53(%)	48(%)
5		75
7	55	
9	94	100
10	35	39
11		69
12	74	
13	66	
14		70
15	53	
16	61	
17	40	
18		70

Abbreviation: AMPL=Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test, AMTDT=Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test

B. 塗抹陰性培養陰性肺結核患者における核酸増幅法陽性の意義

検査台帳の記録から、調査対象期間中に喀痰の AMPL が陽性であった患者は245人、AMTDT では89人であった。これらの患者すべてのカルテおよび胸部レントゲンを検討し、核酸増幅法陽性時の状態を調査した。結果の要約を Table 2 に示す。

AMPL 陽性で塗抹培養とも陰性であった8例のうち、3例は化学療法開始後の肺結核患者であり、1例は抗結核化学療法後数ヶ月の状態でもその後も臨床的再発は見られておらず、3例は臨床経過より偽陽性と判断され(1例は肺化膿症、他の2例は肺炎、いずれも抗結核剤を投与せず1年以上経過観察中であるが発症なし)、真の未治療活動性肺結核と判断された例は1例のみであった。よって未治療の患者においては塗抹培養とも陰性の場合、真の陽性は25%(1/4)であった。

同様に AMTDT 陽性で塗抹培養とも陰性であった7例のうち、1例は臨床経過不明、3例は化学療法開始後の患者であり、残り3例が真の未治療活動性肺結核と判断され、偽陽性と判断された例はなかった。分析可能な未治療の患者においては塗抹培養ともに陰性の場合、真の陽性は100%(3/3)であった。

考 察

本研究は Retrospective study であり、全例に核酸増幅法検査が行われているわけではないため、塗抹陰性の肺結核における核酸増幅法検査の真の陽性率を厳密に知りうる調査ではない。当院においては、臨床医は菌量の少ないと予想された患者において好んで核酸増幅法検査を提出する傾向があるため、本調査で算出した陽性率は実際よりも低くなっている可能性がある。このため、核酸増幅法の陽性率に影響を与える因子をすべて考慮したわけではないものの、最も強い影響の考えられる培養陽性率(R)および培養最大コロニー数(C)で階層化して検討した。われわれの検討では複数回行われた検痰の培養最大コロニー数(C)は核酸増幅法陽性率に影響を与えないようであるが、この培養最大コロニー数(C)は患者の排菌量の指標とはなりえていない可能性もある。しかし培養陽性率(R)は有意に核酸増幅法の陽性率に影響を与え、これによって全塗抹陰性培養陽性肺結核患者に外挿して計算された各核酸増幅法陽性率(AMPL, AMTDT でそれぞれ44.2%, 40.0%)は基のデータ(AMPL, AMTDT でそれぞれ39.2%, 40.5%)とそれほど異なっていない。

Table 3 にこれまでの報告^{3) 5) 7) 9) ~ 18)}での塗抹陰性培養陽性検体における核酸増幅法陽性率を示す。この Table 3 の各数値は培養陽性である検体そのものの検討であり、患者ベースでの検討ではないことに注意が必要である。この中で特異的に高い陽性率を報告している文献9を除く報告では陽性率は高くても70%前後であり、総説等^{2) 3)}においては塗抹陰性培養陽性検体における核酸増幅法陽性率は一般に40~70%程度とされる。この70%という報告は、われわれの検討での $R > 0.67$ の群における陽性率とはほぼ一致している。また塗抹陰性培養陽性の肺結核患者においてさらに核酸増幅法検査を1回追加した時の陽性率は、培養陰性検体における核酸増幅法検査陽性の可能性を無視すれば、核酸増幅法検査に提出した検体が培養陽性である確率に培養陽性検体の核酸増幅法陽性率を掛け合わせて計算される。われわれの検討では塗抹陰性培養陽性肺結核患者におけるRの平均値は約65%であり、よって塗抹陰性肺結核患者での1回の核酸増幅法検査の陽性率は単純計算で $65\% \times 70\% = 45.5\%$ となる。これはわれわれの今回のデータとはほぼ一致する値である。従って本調査は Retrospective study であるための基本的制約があるもの、およびその実情をあらわしているものと思われる。

喀痰塗抹陰性培養陽性の肺結核患者において核酸増幅法検査を1回実施した場合の陽性率が約40%という今回の結果は、核酸増幅法検査が非常に鋭敏であるという

一般の期待とは大きくかけ離れたものであり、核酸増幅法陰性をもっては塗抹陰性培養陽性の肺結核患者である可能性をそれほど否定できないということになる。

また塗抹培養とも陰性の肺結核を核酸増幅法検査によって診断しうる可能性も今回の調査からはそれほど高くはないことが予想される。排菌量の少ないと予想される患者においてより頻繁に核酸増幅法検査が提出される傾向にあるにもかかわらず、結核専門病院である当院において、核酸増幅法で診断可能であった塗抹培養ともに陰性の肺結核患者は3年間でわずかに1例 (AMPL) および3例 (AMTDT) であった。特に AMPL では、抗結核薬の投与を受けていない塗抹培養ともに陰性であった患者においての核酸増幅法陽性は、多くの場合偽陽性を意味しており、塗抹培養ともに陰性の患者においては核酸増幅法陽性の解釈には慎重であるべきであることを示唆している。今回 AMTDT では偽陽性は見られなかったが、他の検体では偽陽性も経験されており、AMTDT が AMPL よりも偽陽性が少ないのかどうかは今後の検討課題である。

以上の調査より、少なくとも現在市販されている検査キットでの結核菌核酸増幅法検査は塗抹陰性の肺結核の診断感度に関してはそれほど高くなく、その限界が示唆される。よって塗抹陰性結核における核酸増幅法の有用性は多くの場合その迅速性に求められることになろう。しかし自施設で依頼に応じてその都度すぐに核酸増幅法検査を施行するにはランニングコストの面から困難であり、ほとんどの施設では週に数回まとめて検査せざるを得ないのが現状であろう。また核酸増幅法におけるキャリアオーバーコンタミネーションの制御には空調等に多額の設備投資を必要とするため、精度の高い検査のためにはほとんどの施設で外注検査に頼らざるを得ず、迅速性の面でもやや後退せざるを得ない。

ATS (American Thoracic Society) から最近出された結核診断に関する statement¹⁹⁾ では、「現時点では核酸増幅法をどのような場合に如何に用いるかは各症例に応じて個々に判断せざるを得ず」、また「結果を鵜呑みにすることなく他の臨床所見を勘案して判断すること」としており、例えば免疫不全状態の患者などで可及的迅速な診断が必要な場合などでの有用性を挙げている。しかし今回のわれわれの検討からは少なくともスクリーニングとして核酸増幅法検査を行うことは費用や効率の面から言っても避けるべきであろう。

結核臨床の基本は現在でもやはり塗抹培養検査であることには変わらない。近年日本でも導入の進んでいる液体培地では培養陽性までの期間が1~3週間とかなり短縮され、かつ固形培地よりも感度においても優れており¹⁹⁾、塗抹陽性患者では培養後の同定検査や主要

4剤に対する薬剤感受性試験まで含めても2週間程度で完了する例も珍しくない。今回のわれわれの検討からは、核酸増幅法検査を広く行ったり自施設での検査の導入を行ったりするよりも、むしろ液体培地システムの導入の優先を検討すべきであることが示唆されよう。

謝 辞

調査に協力いただいた複十字病院病歴室、同細菌検査室ならびに SRL 社の木村純子氏および本山禎二氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Toman K: Tuberculosis Case-finding and Chemotherapy: Question and answers. Geneva: World Health Organization, 1979; 6-72.
- 2) Wroth A, Stabbing T, Mauch H: Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspectives. Eur J Respir Dis. 1997; 10: 1877-1891.
- 3) American Thoracic Society Workshop: Rapid Diagnostic Tests for Tuberculosis. What is the Appropriate use? Am J Respir Crit Care Med. 1997; 155: 1804-1814.
- 4) Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al.: Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Directory from Sputum Sediments by Amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1993; 31(9): 2410-2416.
- 5) Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, et al.: Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens by a Target-Amplified Test System. J Clin Microbiol. 1994; 32(4): 918-923.
- 6) Vuorinen P, Mirttinen A, Vuento R, et al.: Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test and Roche Amplicor *Mycobacterium Tuberculosis* Test. J Clin Microbiol. 1995; 33(7): 1856-1859.
- 7) D'Amonto RF, Wallman AA, Hochstein LH, et al.: Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis by Using Roche AMPLICOR *Mycobacterium Tuberculosis* PCR Test. J Clin Microbiol. 1995; 33(7): 1832-1834.
- 8) Beavis KG, Lichty MB, Jungkind DJ, et al.: Evaluation of Amplicor PCR for Direct

- Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Sputum Specimens. J Clin Microbiol. 1995; 33 (10) : 2582-2586.
- 9) Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. : Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche RCR-Microwell Plate Hybridization Method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for Direct Detection of Mycobacteria. J Clin Microbiol. 1996; 34 (1) : 130-133.
- 10) Lebrun L, Mathieu D, Saulnier C, et al. : Limits of commercial molecular tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Eur Respir J. 1997; 10 : 1874-1876.
- 11) Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ : Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and PCR for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens. J Clin Microbiol. 1996; 34 (1) : 393-397.
- 12) Carpentier E, Drouillard B, Dailloux M, et al. : Diagnosis of Tuberculosis by Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test : a Multi-center Study. J Clin Microbiol. 1995; 33 (12) : 3110-3136.
- 13) Moore DF, Curry JI : Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum Sediments by Amplicor PCR. J Clin Microbiol. 1995; 33 (10) : 2686-2691.
- 14) Abe C, Hirano K, Wada M, et al. : Detection of Mycobacterium tuberculosis in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol. 1993; 31 (12) : 3270-3274.
- 15) Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al. : Evaluation of Roche Amplicor PCR Assay for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1996; 34 (1) : 134-139.
- 16) Bennedsen J, Thomsen VO, Pfyffer GE, et al. : Utility of PCR in Diagnosing Pulmonary Tuberculosis. J Clin Microbiol. 1996; 34 (6) : 1407-1411.
- 17) Bergman JS, Woods GL : Clinical Evaluation of the Roche AMPLICOR PCR Mycobacterium Tuberculosis Test for Detection of *M. tuberculosis* in Respiratory Specimens. J Clin Microbiol. 1996; 34 (5) : 1083-1085.
- 18) Bradley SP, Reed SL, Catanzaro A : Clinical Efficacy of the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 153 : 1606-1610.
- 19) American Thoracic Society : Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161 : 1376-1395.