

호흡기 검체를 이용한 AdvanSure TB/NTM Real Time PCR Kit의 항산균 진단 능력평가

김영진¹ · 박미영¹ · 김신영¹ · 조선아¹ · 황상현¹ · 김형희¹ · 이은엽¹ · 정윤성² · 김경희³ · 장철훈¹

부산대학교 의학전문대학원 진단검사의학교실¹, 울산대학교 의과대학 진단검사의학교실², 동아대학교 의과대학 진단검사의학교실³

Evaluation of the Performances of AdvanSure TB/NTM Real Time PCR Kit for Detection of Mycobacteria in Respiratory Specimens

Young Jin Kim, M.D.¹, Mi Young Park, M.D.¹, Shine Young Kim, M.D.¹, Son A Cho, M.D.¹, Sang-Hyun Hwang, M.D.¹,
Hyung Hoi Kim, M.D.¹, Eun Yup Lee, M.D.¹, Joseph Jeong, M.D.², Kyeong Hee Kim, M.D.³, and Chulhun L. Chang, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine¹, School of Medicine, Pusan National University, Busan; Department of Laboratory Medicine²,
College of Medicine, Ulsan University, Ulsan; Department of Laboratory Medicine³, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea

Background : PCR is a widely used method for rapid and accurate diagnosis of mycobacteriosis. The sensitivity and specificity of a real time PCR kit newly developed in Korea were evaluated for detecting mycobacteria in respiratory specimens.

Methods : One hundred twenty nine *Mycobacterium tuberculosis* (TB) culture positive respiratory specimens (82 AFB stain positive and 47 stain negative specimens) were used for evaluation of the sensitivity. Nine non-tuberculous mycobacteria (NTM) culture positive specimens were also included. For evaluation of the specificity, 48 AFB stain and culture negative respiratory specimens from patients who were initially not fully excluded from mycobacterial diseases (specificity group 1) were used. Other 51 respiratory specimens from patients who were not suspected of mycobacterial diseases were also included (specificity group 2). Real time PCR was performed by using AdvanSure TB/NTM real time PCR Kit (LG Lifescience, Korea) and SLAN real time PCR detection system (LG Lifescience). The target genes of TB and NTM were IS6110 and *rpoB*, respectively.

Results : Among 129 TB culture positive specimens, 82 of 82 AFB stain positive specimens (100%) and 35 of 47 (74.5%) stain negative specimens revealed real time PCR positivity for TB, resulting in sensitivity of 90.7%. Five of nine NTM culture positive specimens resulted in real time PCR positivity for NTM (55.6%). Forty seven of 48 specimens (97.9%) and all 51 specimens (100%) of the specificity group 1 and 2, respectively, were real time PCR negative for TB and NTM.

Conclusions : AdvanSure TB/NTM real time PCR Kit should be useful for detecting TB in respiratory specimens with high sensitivity and specificity. (*Korean J Lab Med* 2008;28:34-8)

Key Words : *Mycobacterium tuberculosis*; Non-tuberculous mycobacteria; Real time PCR, Respiratory specimens

접 수 : 2007년 11월 23일 접수번호 : KJLM2089
수정본접수 : 2007년 11월 30일
게재승인일 : 2007년 12월 24일
교 신 저 자 : 장 철 훈
우 602-739 부산광역시 서구 아미동 1-10
부산대학교병원 진단검사의학과
전화 : 051-240-7417, Fax : 051-247-6560
E-mail : cchl@pusan.ac.kr

*본 연구는 (주)LG 생명과학의 용역 연구과제에 의해 수행되었음.

서 론

결핵 환자의 관리에 가장 중요한 요소가 환자의 조기 발견이다. 환자를 조기에 발견하기 위한 방법으로 호흡기 검체로부터 직접 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, TB)을 검출할 수 있는 분자생물학적인 방법이 도입되면서 미국 식품의약품안전청의 승인을 받

은 제품을 포함한 많은 검사 키트들이 호흡기 결핵의 진단에 이용되고 있다[1, 2]. 그 중 대표적인 두 가지 상품화된 키트는 Enhanced *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (E-MTD, Gen-Probe, San Diego, CA, USA)와 Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor, Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA)로, 문헌에 보고된 이들의 민감도와 특이도는 호흡기 검체를 대상으로 검사했을 때 각각 90-95%, 99-100%에 이를 정도로 매우 우수한 성적을 보여준다고 한다[2]. 하지만 실제 동일한 키트를 이용하여 국내에서 시행한 연구를 보면 임상 검체, 특히 호흡기 검체를 이용하여 검사하였을 때의 민감도 62-88%, 특이도 86-100% 정도로 외국의 보고보다 낮은 성적을 보일 뿐 아니라 편차가 큰 결과를 보여주고 있다[3-5]. 또한 이 키트들의 주요한 단점은 결핵 여부를 확인할 수 있는데 그치고, 결핵 이외의 항산균의 존재에 대해서는 아무 정보도 얻을 수 없다는 점이다. 이는 후천성 면역결핍 환자의 증가와 면역억제 요법의 일반화에 따라 비결핵 마이코박테리아(non-tuberculous mycobacteria, NTM)에 의한 감염이 전 세계적으로 증가 추세를 보이고 있고[6, 7], 최근 우리나라에서도 결핵과 더불어 NTM 감염증이 증가하고 있는 현실에 비추어 볼 때 중요한 단점이 아닐 수 없다[8]. 특히, NTM 감염증은 대부분 항결핵 치료에 저항성을 가지므로 결핵균과 NTM을 초기에 구별할 수 있는 진단법과 이를 통한 구별된 치료 적용의 필요성이 증가하고 있다.

본 연구에서는 국내에서 real time PCR 방법을 기반으로 하여 검체에서 직접 결핵균 혹은 NTM을 검출할 수 있는 키트가 새롭게 개발되었기에, 호흡기 검체를 이용하여 이 키트의 민감도와 특이도를 평가해 보았다.

대상 및 방법

1. 대상

2007년 4월부터 5월까지 부산대학교병원 미생물검사실에 항산균 염색 및 배양 또는 일반세균 배양이 의뢰된 호흡기 검체를 대상으로 하였다. 임상 검체에서의 검출 능력을 보기 위하여 마이코박테리아가 배양된 총 44명 환자의 객담 또는 기관지 폐포 세척액 138검체를 이용하였다. 이 중 항산균 염색에서 미국 질병예방통제국의 검사보고 기준[9, 10]으로 ±이상의 결과를 보인 검체는 85건이었고 나머지 53건은 음성이었다. 특이도 평가를 위한 검체로는 두 종류를 선택하였다. 한 종류는 결핵 또는 NTM 감염증을 의심하거나 배제하기 위하여 항산균 염색과 배양이 의뢰된 호흡기 검체 중에서 두 검사 모두 음성이며, 기타 다른 소견에서 항산균

감염증이 배제된 것으로 47명 환자의 48검체였고(특이도 1군), 나머지 한 종류는 결핵 또는 NTM 감염증이 의심되지 않는 환자로 원내 폐렴 등 일반세균에 의한 호흡기감염증이 의심되어 그람 염색과 일반세균 배양만 의뢰된 호흡기 검체 25명 환자의 51검체를 이용하였다(특이도 2군) (Table 1).

2. 항산균 염색, 배양 및 동정

미생물 검사실에 항산균 염색과 배양이 의뢰된 검체는 둘로 나누어 일부는 4% NaOH로 탈오염과 액화 처리를 실시한 후 항산균 자동염색기 AT-2000F (Dagatron, 고양, 한국)를 이용한 항산균 형광염색과 3% 오가와배지를 이용한 배양 검사를 실시하였다. 나머지 일부는 real time PCR 검사 실시 전까지 -70°C에 보관하였다. Real time PCR을 실시할 때에는 상기의 기준에 맞는 검체만을 차례로 선택하였다. 항산균 배양이 아닌 일반세균 배양이 의뢰된 경우에도 검체의 일부를 real time PCR 검사 실시 전까지 -70°C에 보관하였다. 항산균 배양 양성인 경우에는 PCR-hybridization 방법에 의하여 결핵균과 NTM의 균종을 동정하였다[11].

3. Real time PCR에 의한 TB와 NTM의 검출

1) 검체 전처리

검사 키트는 AdvanSure TB/NTM real time PCR Kit (LG생명과학, 서울, 한국)를 이용하였으며, 검사 과정은 제조사의 설명서에 따라 시행하였다. 객담이나 기관지 세척액 3 mL에 검체 전처리액 I 3 mL를 첨가한 후 1분 간격으로 30초간 2회 vortex를 하고 3,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 뒤 상청액을 제거하였다. 여기에 검체 전처리액 I 1 mL를 첨가한 후 피펫을 이용하

Table 1. Specimens used in this study

Specimens	N of specimens
Mycobacteria culture positive	138
<i>M. tuberculosis</i> , isolated	129
AFB stain positive	82
AFB stain negative	47
Nontuberculous mycobacteria, isolated	9
AFB stain positive	3
AFB stain negative	6
Specificity group 1 (AFB stain/culture negative)	48
Specificity group 2 (non-suspicious for mycobacterial infections)	51
Total	237

Abbreviation: AFB, acid-fast bacilli.

여 침전물을 섞은 후 1.5 mL microtube로 옮겨 1분 간격으로 30초간 5회 vortex하고 상청액을 제거하였다. 이 과정을 검체의 점성이 사라질 때까지 3-5회 반복하였다. 남아있는 침전물은 DNA 추출에 이용하였다.

2) DNA 추출

상기의 침전물을 1.5 mL microtube에 옮기고 검체 전처리액 II 1 mL를 첨가하여 vortex하고, 13,000 rpm에서 3분 동안 원심분리한 뒤 상청액을 제거하였다. 이 과정을 2회 반복한 뒤 추출 완충액 50 μ L를 첨가하고 100°C에서 20분간 가열하였다. 이후 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고, 10초 동안 vortex한 뒤 다시 13,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 분리된 상층액 5 μ L를 PCR에 사용하였다.

3) 5' -exonuclease probe와 시발체

결핵균의 IS6110, 항산균의 *rpoB* 유전자에 특이적인 시발체를 이용하였다. 반응 산물이 형성됨과 동시에 각 유전자에 특이적인 Taqman probe가 분해됨으로써 형광이 형성되는데 형성된 형광을 SLAN real time PCR detection system (LG 생명과학)으로 측정하였다.

4) PCR

2 × PCR mixture가 10 μ L씩 분주되어 있는 200 μ L PCR tube에 TB/NTM primer/probe 혼합물 5 μ L와 추출한 검체 DNA 5 μ L를 첨가하고 SLAN real time PCR detection system을 이용하여 50°C 2분, 95°C 10분간의 변성 단계 후 95°C

Table 2. Real time PCR results of mycobacterial culture positive respiratory specimens

Culture result	Total	PCR positive for		PCR negative (%)
		TB (%)	NTM	
<i>M. tuberculosis</i>				
AFB stain-positive	82	82 (100)	0	0 (0)
AFB stain-negative	47	35 (74.5)	0	12 (25.5)
Total	129	117 (90.7)	0	12 (9.3)
<i>M. intracellulare</i>				
AFB stain-positive	2	0	1	1
AFB stain-negative	1	0	0	1
<i>M. avium</i>				
AFB stain-negative	2	1*	0	1
NTM, unidentifiable				
AFB stain-positive	1	0	1	0
AFB stain-negative	3	0	3	0

*False-positive for non-tuberculous mycobacteria.

Abbreviations: AFB, acid-fast bacilli; TB, *M. tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacteria.

10초, 62°C 40초의 PCR 주기로 35회 시행하였다. PCR 반응의 검출에는 총 3개의 channel (*M. tuberculosis* complex, mycobacteria, internal control)을 이용하였고 각각의 channel에서 FAM, HEX, Cy5 파장의 signal 형성을 확인하여 C_T 값이 35 미만일 때를 양성으로 하였다. 제조사의 지침서대로 각 signal 중 *rpoB*의 C_T 값이 IS6110의 C_T 값보다 4 이상 클 경우 결핵으로 판정하고, 4 이하일 경우 IS6110 copy 수가 적은 *M. tuberculosis* complex 또는 NTM의 coinfection의 가능성이 있는 것으로 해석하였다. *rpoB*의 C_T 값만이 35 이하로 나오는 경우 NTM으로 해석하였다.

결 과

1. 결핵균 배양 양성 검체

129개 검체 중 117개가 real time PCR에서 결핵균 양성 결과를 보였다(민감도 90.7%). 염색 양성 검체 82건 중 82건이 real time PCR에서 결핵균 양성이었다(민감도 100%). 염색 음성 검체 47건 중에서는 35건이 real time PCR에서 결핵균 양성이었다(민감도 74.5%) (Table 2).

2. NTM 배양 양성 검체

9건의 검체 (*M. intracellulare* 3건, *M. avium* 2건, 그 외 NTM 4건; 항산균 염색 양성 3건, 음성 6건) 중 5건이 real time PCR에서 NTM 양성 결과를 보였다(민감도 55.6%). 1건은 TB 양성 결과를 보였다. 이 검체의 경우 IS6110의 C_T 값은 33.79로 cut-off에 가까운 결과를 보였고, *rpoB*의 C_T 값은 'Undetermined'로 제조사의 기준에 의하여 TB로 판정되었다.

3. 특이도 평가

특이도 1군의 평가에서는 총 48검체 중 47개의 검체가 real time PCR에서 TB 또는 NTM 음성 반응을 보였다(특이도 97.9%). TB 양성 결과를 보인 1건의 의무기록을 검토한 결과, 세균성 폐렴에 대한 치료를 받고 회복된 환자의 검체였다. 특이도 2군의 평가에서는 51검체 모두에서 TB 또는 NTM real time PCR 음성이었다(특이도 100%).

고 찰

PCR을 이용하여 임상검체에서 직접 마이코박테리아 감염증을

진단하는 방법은 신속한 결과를 얻을 수 있다는 점에서 임상검사실에서 유용하게 쓰여 왔다. 그러나 상품화된 키트를 임상검사실에서 사용하였을 때 성적은 제품출시 초기 발표된 문헌에서 제시한 만큼의 성적에는 미치지 못하였다. E-MTD와 Amplicor의 2가지 키트를 비교한 연구에서는 민감도가 74-77%로 국내 연구 결과인 민감도 69-88%와 유사한 성적을 보여주었다[4, 5, 12, 13]. 그래서 본 연구에서는 새로 소개되는 키트가 최적의 연구 조건이 아닌 실제 검사실의 환경과 같은 조건에서 어떤 성적을 보이는지를 알아보는데 중점을 두고 실험을 실시하였다. 본 연구 결과, AdvanSure TB/NTM real time PCR은 전체적으로 민감도 88%, 특이도 98%의 우수한 결과를 보였다. 조기 진단과 치료를 위하여 PCR 검사를 시행하는 경우에는 특히 항산균 염색 음성인 검체에서 높은 민감도를 보일 때 더욱 유용하다. Kim 등[4]은 BDProbeTec ET system과 Amplicor를 비교한 연구에서 항산균 염색 음성인 검체에 대한 민감도를 각각 57%, 43%로 보고한 데 반해, 본 연구에서는 항산균 염색 음성이나 배양 결과와 임상 진단으로 결핵으로 진단받은 환자의 검체를 대상으로 75%의 민감도를 보여 기존의 검사법보다 우수한 성적을 보여주었다. AdvanSure TB/NTM real time PCR Kit가 가진 또 다른 장점으로 NTM의 검출이 가능하다는 것이다. 해당 검체수가 적어 NTM 검출 능력에 대한 정확한 평가가 본 연구에서는 어려우나 NTM 감염이 증가하고 있는 상황에서 본 키트가 가진 NTM의 검출 능력은 임상 진료에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 판단된다.

PCR 법이 가지고 있는 문제 중 증폭 산물의 교차 오염에 의한 위양성의 가능성과 증폭 억제 물질의 존재에 의한 위음성은 반드시 해결되어야 할 문제점이다. 본 연구에 이용된 키트는 real time PCR 법을 이용하기 때문에 증폭 후 증폭 산물을 조작하는 과정이 없어서 위양성의 가능성은 원천적으로 매우 낮다. PCR에서 위음성을 보이는 주요 원인인 검체 내 핵산증폭과정 저해 물질의 존재는 배양된 균을 이용하는 것과 달리 임상 검체를 이용한 검사에서 그 가능성이 훨씬 높다. 그래서 Amplicor는 internal control을 이용하여 위음성의 가능성을 확인하는데, 호흡기 검체와 비호흡기 검체를 이용한 연구 결과 저해율은 보고자에 따라 0-10% 정도로 보고되고 있다[14-16]. 본 연구에서 사용된 키트도 internal control용 시발제를 함유하고 있는데, 실험에 이용한 전 검체에서 핵산증폭과정의 저해는 발견되지 않아서, 이에 의한 위음성의 가능성은 거의 없을 것으로 생각된다.

본 연구에 이용된 검체 중 한 건에서 최종 동정 결과와 real time PCR 키트 사이의 불일치가 관찰되었다. 배양된 균의 동정 결과는 *M. avium*이었으나 임상 검체의 PCR 검사에서는 TB 양성 결과를 보인 것이다. 의무기록 검토 결과 환자는 배양 결과에 따라

*M. avium*에 대한 약물치료를 받고 폐병변이 회복되었다. 그런데 이 환자 검체의 C_T 값이 33.79로 cutoff 값인 35 가까이에 있었고, *rpoB*의 증폭이 관찰되지 않았으며, 특별히 TB에 대해 위양성을 보일 만한 사유를 발견할 수 없었다. 따라서 이와 같이 비전형적인 반응이 나오거나, 혹은 C_T 값이 cutoff 가까운 값으로 확인될 때는 위양성의 가능성을 고려하여 결과를 신중히 해석해야 할 것으로 판단된다.

이상의 연구 결과 AdvanSure TB/NTM real time PCR Kit는 우수한 민감도와 특이도로 호흡기 검체를 이용한 결핵 및 비결핵 마이코박테리아 감염증의 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

배경 : PCR법은 마이코박테리아 감염증을 신속하고 정확하게 진단하기 위해 널리 쓰이는 방법이다. 본 연구에서는 국내에서 개발된 real time PCR 방법을 기반으로 한 결핵균과 비결핵항산균 검출 키트의 민감도와 특이도를 평가해 보았다.

방법 : 민감도 평가는 결핵균이 배양된 호흡기 검체 129검체(항산균 염색 양성 82검체, 음성 47검체) 및 비결핵 항산균이 배양된 9개의 검체를 대상으로 실시하였다. 특이도 평가는 처음에 항산균 감염증을 완전히 배제되지 않았으나, 추후 항산균 염색 및 배양 음성이며 항산균 감염증이 배제된 환자의 호흡기 검체 48검체(특이도 1군)와, 처음부터 항산균 감염증을 의심하지 아니하는 환자의 호흡기 검체 51검체(특이도 2군)를 대상으로 하였다. 검사는 AdvanSure TB/NTM real time PCR Kit (LG 생명과학, 한국)와 SLAN real time PCR detection system (LG 생명과학)으로 실시하였다. 결핵균은 IS6110, 마이코박테리아는 *rpoB* 유전자를 각각 증폭시켜 검출하였다.

결과 : 결핵균이 배양된 129개 검체 중 염색 양성 검체 82/82(100%), 염색 음성 검체 35/47(74.5%)로, 총 117개가 real time PCR에서 결핵균 양성 결과를 보였다(민감도 90.7%). NTM 배양 양성 검체 9건의 검체 중 5건(55.6%)이 real time PCR에서 NTM 양성 결과를 보였다. 특이도 1군에서는 48검체 중 47건(97.9%), 특이도 2군에서는 51검체 모두(100%) 결핵 또는 마이코박테리아 PCR 음성이었다.

결론 : AdvanSure TB/NTM real time PCR은 우수한 민감도와 특이도로 호흡기 검체를 이용한 결핵의 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:711-20.
2. Soini H and Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 2001;47:809-14.
3. Park SS, Kwak KR, Hwang JY, Yun SM, Ryue CC, Chang CH, et al. Clinical utility of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* 1999; 47:747-56. (박삼석, 광경록, 황지윤, 윤상명, 류기찬, 장철훈 등. 폐결핵 진단에서 Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test의 임상적 유용성. 결핵 및 호흡기질환 1999;47:747-56.)
4. Kim SY, Park YJ, Kang SJ, Kim BK, Kang CS. Comparison of the BDProbeTec ET system with the roche COBAS AMPLICOR System for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in the respiratory and pleural fluid specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49:13-8.
5. Lee CK, Kim CH, Ma KR, Kim YK, Lee KN, Cheong HJ, et al. Comparison of in-house polymerase chain reaction and Amplicor MTB for diagnosis of tuberculosis in the respiratory specimens. *J Korean Soc Chemother* 1998;16:97-103. (이창규, 김창현, 마경란, 김영기, 이갑노, 정희진 등. 호흡기 검체의 결핵 진단에서 in-house polymerase chain reaction과 Amplicor MTB의 비교. 대한화학요법학회지 1998;16: 97-103.)
6. Khan K, Wang J, Marras TK. Nontuberculous mycobacterial sensitization in the United States: national trends over three decades. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:306-13.
7. Primm TP, Lucero CA, Falkinham III JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:98-106.
8. Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K, Kim TS, Lee KS, Park YK, et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. *Chest* 2006;129:341-8.
9. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
10. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II. Microscopy. Geneva: World Health Organization, WHO/TB/98.258, 1998.
11. Park H, Jang H, Song E, Chang CL, Lee M, Jeong S, et al. Detection and genotyping of *Mycobacterium* species from clinical isolates and specimens by oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2005;43:1782-8.
12. Tortoli E, Tronci M, Tosi CP, Galli C, Lavinia F, Natili S, et al. Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplicor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:173-9.
13. Huang TS, Liu YC, Lin HH, Huang WK, Cheng DL. Comparison of the Roche AMPLICOR MYCOBACTERIUM assay and Digene SHARP Signal System with in-house PCR and culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:3092-6.
14. Eing BR, Becker A, Sohns A, Ringelmann R. Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998;36: 2023-9.
15. Goessens WH, de Man P, Koeleman JG, Luijendijk A, te Witt R, Endtz HP, et al. Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2005;43:2563-6.
16. Scarparo 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.