

Vergleich von drei Nukleinsäure Amplifikations-Methoden zum Nachweis von *Chlamydia trachomatis* Infektionen aus Urinproben in einer Hochrisiko-Gruppe

Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Techniques for the Detection of *Chlamydia trachomatis* Infections from Urine Specimens in a High Risk Group

H. F. Rabenau^{1,2}, J. F. Chenot¹, Annemarie Berger¹, Sonja Leppek³, B. Weber^{1,4}, H.W. Doerr¹

Zusammenfassung: Der Nachweis von *Chlamydia trachomatis* Genomsequenzen ist seit einigen Jahren mit Hilfe kommerzieller Testkits, welche auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder Ligase-Kettenreaktion (LCR) beruhen, möglich. Vor kurzem wurde ein neues Verfahren, die Transcription Mediated Amplification (TMA), etabliert. In der vorliegenden Studie wurden drei Nukleinsäure Amplifikations-Techniken, die PCR, die LCR und die TMA für den Nachweis von *Chlamydia trachomatis* aus Urinproben miteinander bezüglich Sensitivität und Spezifität verglichen und einem Enzym-Immuno-Assay (EIA) zum *C. trachomatis*-Antigen-Nachweis aus endozervikalen Abstrichen gegenübergestellt. PCR, LCR und TMA zeigten eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität. Diskrepante Ergebnisse ergaben sich im Vergleich mit dem *C. trachomatis*-Antigen-Nachweis. In 22 Abstrichen war Chlamydien-Antigen nachzuweisen. Nur bei 12 bzw. 11 der untersuchten Prostituierten konnten bei positivem zervikalen Abstrich *Chlamydia trachomatis* Genomsequenzen im Urin nachgewiesen werden. Bei 5 bzw. 4 Frauen wurde bei negativem Abstrichbefund *C. trachomatis* DNA bzw. RNA im Urin gefunden. Um bei Frauen eine hohe diagnostische Sensitivität zu erreichen, sollten Urin und endozervikale Abstriche untersucht werden, da *C. trachomatis* nicht immer in beiden Probematerialien nachweisbar ist.

Schlüsselwörter: Genamplifikation; Immunozytekniken; Chlamydieninfektionen/Urin; Reagenzkits, Diagnostische; Urethra/Mikrobiologie; Sensitivität und Spezifität.

Summary: Commercial test kits based on the polymerase chain reaction (PCR) or ligase chain reaction (LCR) for the detection of *Chlamydia trachomatis* genome sequences in first void urine (FVU) were introduced a few years ago. Recently, transcription mediated amplification (TMA) has been established as an additional detection method. In the present study three nucleic acid amplification techniques, PCR, LCR and TMA using FVU samples and *C. trachomatis* antigen detection with enzyme immunoassay (EIA) from endocervical swabs were compared regarding sensitivity and specificity. TMA showed a sensitivity comparable to PCR and LCR. Discrepant results were observed between nucleic acid amplification techniques on FVU samples and antigen detection using cervical swabs. *C. trachomatis*-antigen was detected in 22 swabs. In 11 and 12 women, antigen could be detected in cervical swabs without positive result in PCR and LCR or TMA or FVU, respectively. 5 and 4 FVU gave a positive result in PCR and LCR or TMA, respectively, with negative cervical swab. In order to achieve a high diagnostic sensitivity in women, both FVU and endocervical swabs should be investigated, since *C. trachomatis* may not necessarily be detected in both specimens.

Keywords: Gene-Amplification; Immunoenzyme-Techniques; Chlamydia-Infektionen/urine; Reagent-Kits, -Diagnostic; Urethra/microbiology; Sensitivity and Specificity.

Chlamydia trachomatis ist einer der häufigsten sexuell übertragbaren Erreger in Industrieländern. Die klinischen Manifestationen der *C. trachomatis*-Infektion sind Urethritis und Epididymitis beim Mann und Zervizitis, Salpingitis und pelvic inflammatory disease (PID) bei der Frau. Eine schwerwiegende Spätfolge der chronischen Infektion mit *C. trachomatis* ist die Sterilität durch Tubenverschuß. Um die weitere Übertragung, Komplikationen und Spätfolgen der urogenitalen *C. trachomatis*-Infektion zu vermeiden, ist eine adäquate Therapie notwendig. Doxzyklin, Makrolide und Chinolone (Ofloxacin und Ciprofloxacin)

¹Institut für Med. Virologie, Universitätskliniken Frankfurt, Deutschland

²Korrespondenzadresse: Priv. Doz. Dr. Holger F. Rabenau, Institut für Medizinische Virologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main, Paul Ehrlich-Str. 40, D-60596 Frankfurt a. M. Fax: 069/6301-6477, E-mail: Rabenau@em.uni-frankfurt.de

³Stadtgesundheitsamt Frankfurt, Deutschland

⁴Laboratoires Réunis Kutter-Lieners-Hastert, Junglinster, Luxembourg

Eingegangen: 16. 12. 1997

haben sich als effektiv erwiesen. Die Einmal-Therapie mit Azithromycin verbessert die Compliance der antibiotischen Therapie bei Hoch-Risiko-Patienten [1].

Besondere Probleme bei der *C. trachomatis*-Infektion ergaben sich im Hinblick auf die Labordiagnose. Die Isolierung in der Zellkultur ist, obwohl sie relativ sensitiv ist, arbeitsaufwendig, erfordert erfahrenes Personal und bleibt auf wenige Laboratorien mit der Möglichkeit der Zellkultivierung beschränkt. Der Nachweis von Chlamydien-Antigen mit Immunfluoreszenztest (IFT) oder Enzym-Immunoassays (EIA) erlaubt es, eine große Probenanzahl zu untersuchen, die Sensitivität dieser Methoden ist jedoch beschränkt. Zudem kann der EIA falsch positive Ergebnisse liefern [2]. Serologische Tests wie die Komplementbindungsreaktion (KBR), Mikroimmunfluoreszenz (MIF) und EIA sind trotz spezieller bzw. genuspezifischer Differenzierungsmöglichkeiten für die Diagnose der *C. trachomatis*-Infektion nur von begrenztem Wert.

Neuerdings wurde die Labordiagnose der Chlamydien-Infektionen durch die Einführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und der Ligase-Ketten-Reaktion (LCR) verbessert. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, daß DNA-Amplifikations-Techniken deutlich sensitiver sind als Antigen-Nachweis-Methoden [3-9]. Darüber hinaus ermöglichen sie durch den Nachweis von DNA-Sequenzen in Urinproben eine nicht-invasive Labordiagnostik und Therapiekontrolle.

In der vorliegenden Studie wurde die Transcription Mediated Amplifikation (TMA), bei der über DNA-Zwischenprodukte spezifische ribosomale RNA-Sequenzen nachgewiesen werden (Gen-Probe® Amplified *Chlamydia trachomatis* Assay, Gen-Probe, Inc., San Diego, California, USA) mit der PCR (*Chlamydia trachomatis* Amplicor, Roche, Branchburg, NJ, USA) und der LCR (LCx *Chlamydia trachomatis* assay, Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA) anhand eines Kollektives von Urinproben von Prostituierten (Hochrisiko-Gruppe) verglichen. Weiterhin wurden die Ergebnisse der Nukleinsäureamplifikationsmethoden einem Enzymimmunoassay für den Antigennachweis in Cervixabstrichen gegenübergestellt.

Material und Methoden

Patientenkollektiv

Weibliche Prostituierte, welche routinemäßig vom Stadtgesundheitsamt Frankfurt am Main untersucht wurden (n=265).

Probengewinnung

Proben vom ersten Morgenurin (25-40 ml) wurden in Plastikröhrchen mit Schraubverschluß gesammelt und

maximal 24 h bei 4 °C gelagert (n=265). Am Institut für Medizinische Virologie wurden die Proben in drei gleiche Portionen aufgeteilt und bei -20 °C tiefgefroren bis sie untersucht wurden. Zusätzlich wurden endozervikale Abstriche entnommen (n=249). Wenn eitriges Exsudat vorhanden war, wurde die Entnahmestelle mit einem Baumwollstäbchen gereinigt bevor der Testabstrich entnommen wurde.

PCR

Die PCR (Amplicor™ *Chlamydia trachomatis* Test, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA) wurde entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt und interpretiert. Die Ziel-DNA für die PCR ist auf einem kryptischen Plasmid lokalisiert, das in allen Serovaren von *C. trachomatis* vorkommt. Jedes Elementarkörperchen von *C. trachomatis* besitzt etwa 10 Kopien des Plasmids. Die Retikularkörperchen enthalten gleichfalls wenigstens 10 Kopien, abhängig vom Stadium der Replikation [10].

LCR

Die LCR (LCx *Chlamydia trachomatis* assay, Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA) wurde ebenfalls entsprechend der Herstellerhinweise durchgeführt und interpretiert. Die Ziel-DNA für die LCR befindet sich wie bei der PCR auf einem kryptischen Plasmid. Die Detektion des LCR-Amplifikats erfolgte mit dem LCx-Analysegerät.

Transcription mediated amplification (TMA)

Die TMA (GEN-Probe® Amplified *Chlamydia trachomatis* assay, Gen-Probe Inc. San Diego, California, USA) amplifiziert ribosomale RNA von *C. trachomatis* über DNA-Zwischenprodukte. Im ersten Schritt der Amplifikation bindet der Promotor-Primer an die Ziel-rRNA und wird durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die RNA wird im Heteroduplex aus RNA und DNA durch die RNase H-Aktivität der Reversen Transcriptase (RT) abgebaut. Ein zweiter Primer bindet an die cDNA und doppelsträngige DNA wird durch die RT synthetisiert. Von jedem DNA-Strang stellt die RNA-Polymerase 100 bis 1000 Kopien des RNA-Amplifikats her, die wieder in den TMA-Zyklus eintreten. Der Nachweis des Amplifikats erfolgt durch einen Hybridisierung-Schutz-Versuch (HPA). Acridinium-Ester (AE)-markierte DNA-Sonden werden zu den Proben hinzu gegeben. Der Acridinium-Ester von nicht-hybridisierten Sonden wird durch ein selektives Agens hydrolysiert. Die TMA wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Zum Nachweis von Amplifikaten wurde der Gen-Probe® Leader Luminometer verwendet. Proben mit einem Signal über dem cut-off Wert (50, 000 RLU) wurden als positiv bewertet.

Probenvorbereitung, Amplifikation und Nachweis wurden in getrennten Laborbereichen durchgeführt,

Nicht standardisierte Abkürzungen: AE, Acridinium-Ester; FVU, first void urine; IFT, Immunfluoreszenztest; KBR, Komplementbindungsreaktion; LCR, ligase chain reaction; MIF, Mikroimmunfluoreszenz; PCR, polymerase chain reaction; PID, pelvic inflammatory disease; TMA, transcription mediated amplification.

um Kontaminationen zu vermeiden. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die relevanten Merkmale der verschiedenen *C. trachomatis* Nukleinsäure-Amplifikations-Methoden.

EIA

Der *C. trachomatis*-Antigennachweis in zervikalen Abstrichen wurde mit dem Micro Trak II Chlamydia EIA-Kit (Syva, Palo Alto, USA) durchgeführt. Micro Trak II weist typenspezifische Lipopolysaccharidproteine (LPS) von *C. trachomatis* nach.

Ergebnisse

Aus den Urinproben der weiblichen Prostituierten konnte mittels PCR in 18 von 265 Proben *C. trachomatis*-DNA amplifiziert werden. 16 Proben wurden mittels TMA und LCR positiv getestet (Tab. 2). Die

beiden in der LCR negativen und in der PCR positiven Proben ergaben LCR Indexwerte nahe am cut-off. Eine TMA negative aber PCR positive Probe war in der LCR positiv. Eine weitere Probe war negativ in der TMA und LCR, obwohl der zervikale Abstrich dieser Patientin *C. trachomatis*-Antigen EIA positiv war.

C. trachomatis-Antigen wurde in 22 endozervikalen Abstrichen gefunden. Bei Antigen positiven Abstrichen wurden mit der PCR bei nur 11 und mit der TMA bzw. LCR bei 10 Prostituierten positive Urinproben gefunden. Umgekehrt waren 5, bzw. 4 Urinproben in der PCR bzw. TMA oder LCR positiv bei Antigen negativen endozervikalen Abstrichen.

Wurde die PCR als Referenzmethode betrachtet, ergab sich für die TMA eine Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert von 88,9%, 100%, 100%, bzw. 99,2%. Im Vergleich zur LCR zeigte die TMA eine Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Vorhersagewert vom 93,8%, 99,6%, 93,8%

Tabelle 1 Übersicht über die verschiedenen *C. trachomatis* Nukleinsäure-Amplifikations Techniken

Test-Prinzip	Transcription mediated amplification (TMA)	Polymerase chain reaction (PCR)	Ligase chain reaction (LCR)
Test-Bezeichnung	Gen-Probe® Amplified <i>Chlamydia trachomatis</i> assay, Gen-Probe Inc.	Amplicor™ <i>Chlamydia trachomatis</i> Test	LCx <i>Chlamydia trachomatis</i> assay
Hersteller	Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA	Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ USA	Abbott Diagnostics, North Chicago, IL, USA
Notwendige Ausrüstung	Heizblöcke (42, 60 und 95 °C), Multitube-Vortexer und Luminometer	PCR Standardausrüstung	PCR-Standardausrüstung und LCx-Analyser
Nachweissystem	Chemolumineszenz (Luminometer)	ELISA (Photometer)	Fluoreszenz
Kontaminations-Prävention	Keine	Amperase	Nukleinsäure-Inaktivierungs-Reagenz (Kupfer-Phenathrolin Komplex)
Test-Zeit	2 - 2,5 Std.	4 Std.	4 - 5 Std.
Durchschnittliche Kosten für Reagenzien	ca. 20,- DM	ca. 20,- DM	ca. 20,- DM

Tabelle 2 Ergebnisse der TMA, PCR und LCR aus Urinproben (n=265) und Antigennachweis von zervikalen (n=249) Abstrichen von Prostituierten im Vergleich

Test	Ergebnisse	TMA		PCR		LCR		Antigennachweis	
		pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
TMA	pos.	16	0	16	0	15	1	10	4
	neg.	0	249	2	247	1	248	12	223
PCR	pos.			18	0	16	2	11	5
	neg.			0	247	0	247	11	222
LCR	pos.					16	0	10	4
	neg.					0	249	12	223
Antigen-nachweis	pos.							22	0
	neg.							0	227

bzw. 99,6%. Die Sensitivität der PCR, LCR und TMA in Urinproben im Vergleich mit dem EIA in endozervikalen Abstrichen lag bei 50%, 45,4% beziehungsweise 45,4%. Im Vergleich zum erweiterten Goldstandard, der aus der Kombination von PCR und Antigennachweis aus endozervikalen Abstrichen besteht, lag die Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert der TMA bei 55,2%, 100%, 100% bzw. 94,8%. Für die PCR und LCR lagen die Ergebnisse bei 62,1%, 100%, 100%, 95,0% bzw. bei 55,2%, 100%, 100% und 94,8%.

Diskussion

Beim Nachweis von *C. trachomatis* in Urinproben von weiblichen Prostituierten zeigt die neuere TMA eine der PCR und LCR vergleichbare Sensitivität und Spezifität. Nur bei einer Urinprobe ergab sich ein diskrepantes Ergebnis im Vergleich zur LCR.

Um eine hohe diagnostische Sensitivität der Untersuchung von Frauen zu erreichen, sollte sowohl Urin als auch ein endozervikaler Abstrich untersucht werden, da die Infektion nicht immer in beiden Lokalisationen nachweisbar ist. So konnte in einer weiteren Studie mit 314 Probanden gezeigt werden, daß von insgesamt 34 LCR positiv getesteten Proben 9 bzw. 5 nur im Abstrich respektive Urin reaktiv waren (20 Proben zeigten sich in beiden Untersuchungsmaterialien positiv) (Rabenau et al., unveröffentlichte Daten).

Diskrepanzen zwischen den Amplifikations-Methoden aus Urin und dem Antigennachweis aus endozervikalen Abstrichen wurden in 16 (6,0%) der weiblichen Prostituierten beobachtet. Die Zellkultur und der Antigennachweis mittels EIA werden nach antibiotischer Therapie negativ, während die PCR bis zu zwei Wochen nach Therapiebeginn noch positiv sein kann, durch den Nachweis persistierender DNA [11]. Es wurde beobachtet, daß Prostituierte vor Routineuntersuchungen durch das Gesundheitsamt häufig eine antibiotische Kurztherapie durchführen (Leppek et al., unveröffentlichte Daten).

In Übereinstimmung mit Skulinick et al. [12] und Jensen et al. [13], wurden im Urin weniger Chlamydien-Infektionen als bei der Untersuchung der endozervikalen Abstriche gefunden. Ein Teil der divergenten Ergebnisse ist möglicherweise der falsch positiven Reaktivität (Kreuzantigenität) des Antigennachweises (EIA) zuzuschreiben. Für den Antigentest sind bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen mit *E. coli*, B-Streptokokken und *Neisseria gonorrhoeae* u. a. beschrieben [14].

Die Spezifität von Antigennachweisen mittels EIA wurde auf 65-92% bestimmt [2]. Von den 12 EIA positiven Abstrichen sollten demnach höchstens 1-4 Proben als möglicherweise falsch positiv betrachtet werden.

Auf der anderen Seite erscheint es wahrscheinlich, daß die Anwesenheit von Polymerase oder Transcrip-

tase-Inhibitoren im Urin zu falsch negativen Ergebnissen bei den Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken führt. Durch Spiken mit *C. trachomatis* bzw. die Hinzunahme eines internen Standards wird die Anwesenheit von Inhibitoren im Untersuchungsmaterial erkannt.

Inhibitoren der Taq-Polymerase können nach Einfrieren oder Aufkochen der Proben inaktiviert oder durch Zentrifugation konzentriert werden [15, 16]. Weitere Methoden wie die Verdünnung der Urinproben wurden zur Inaktivierung der Inhibitoren vorgeschlagen [9].

Die PCR erscheint unter bestimmten Bedingungen relativ unsensitiv. In einer Studie von Miettinen et al. [17] war die Nukleinsäure-Hybridisierung (PACE 2, Gen-Probe) sensitiver als die PCR (Amplicor). Die derzeit im internationalen Handel erhältlichen Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren sollten noch verbessert werden, bevor sie als zuverlässige Methode zum Screening von *C. trachomatis* in Urinproben eingesetzt werden.

Von entscheidender Bedeutung für die Einführung von Nukleinsäure-Amplifikations-Verfahren in die Labordiagnostik sind ihre Anwendbarkeit unter Routinebedingungen, Kosten für Reagenzien und die Empfindlichkeit gegenüber Kontaminationen (Tab. 1). Die Probenaufbereitung ist bei allen drei Verfahren schnell und einfach durchzuführen. Die nötigen Vorbereitungsschritte sind bei der PCR und LCR auf ein Minimum reduziert. Die TMA hat mit 75 min die kürzeste Amplifikationszeit. Die PCR und LCR benötigen beide 120 min zur Amplifikation. Der Nachweis von Amplifikaten ist bei der LCR vollautomatisiert und kann auch für die PCR mit dem Cobas Core Gerät (Amplicor) automatisiert werden. Obwohl der Nachweis von TMA-Amplifikaten manuell durchgeführt wird, werden für die fünf Reaktionsschritte bis zum Ergebnis nur 30 min benötigt. Die insgesamt benötigte Zeit beträgt für TMA 2 Std. bis 2 Std. 30 min, für die PCR 4 Std. und für die LCR 4-5 Std.. Die Kosten für die Reagenzien liegen bei allen drei Methoden im selben Bereich.

Bei den Nukleinsäure-Amplifikationstechniken besteht prinzipiell das Risiko einer Kontamination mit DNA- oder RNA-Amplifikaten. Bei der Amplicor *C. trachomatis* PCR können Kontaminationen durch AmpErase® (Uracil N-Glycolase, UNG), welche selektiv vor der Amplifikationsreaktion die in Amplifikate integrierte dUTPs hydrolysiert, eliminiert werden. Um LCR-Kontaminationen vorzubeugen, werden Amplifikate durch ein Nukleinsäure inaktivierendes Reagenz (Kupfer-Phenanthrolin-Komplex), welches automatisch nach der Auswertung im LCx-Analysegerät zugegeben wird, zerstört. Für die TMA ist kein Inaktivierungsverfahren der Amplifikate vorgesehen. Da die TMA-Amplifikation in offenen Röhrchen mit einer Ölschicht durchgeführt wird, ist das Kontaminationsrisiko erheblich höher als bei der PCR und LCR, andererseits sind RNA-Amplifikate weniger stabil als DNA-Amplifikate. Das Risiko der Kontamination ist

bei der LCR am niedrigsten, da dieselben Reaktionsgefäße für Amplifikation und Detektion verwendet werden und während des gesamten Vorgangs geschlossen bleiben. Um Kontaminationen bei allen drei Verfahren zu vermeiden, müssen die allgemeine Empfehlungen, z. B. „good laboratory practice“ und die räumliche Trennung der einzelnen Teilschritte bei der Durchführung beachtet werden.

Anmerkungen

Diese Arbeit wurde von DPC Biermann (Bad Nauheim), Hoffmann-La Roche (Grenzach-Whylen) und Abbott (Delkenheim) unterstützt.

Literatur

1. Martin DH, Mroczkowski TF, Dalu ZA, McCarty J, Jones RB, Hopkins SJ, Johnson RB, Azithromycin for Chlamydial Infections Study Group. Controlled trial of a single dose of azithromycin for the treatment of chlamydial urethritis and cervicitis. *N Engl J Med* 199;327:921-5.
2. Schachter J, Stamm WE. Chlamydia. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th Edition. Washington (DC):ASM Press, 1995:669-77.
3. Bianchi A, Scieux C, Brunat N, Vexiau D, Kermanach M, Pezin P, Janier M, Morel P, Lagrange PH. An evaluation of the polymerase chain reaction amplicor *Chlamydia trachomatis* in male urine and female urogenital specimens. *Sex Transm Dis* 1994;21:96-200.
4. Chernesky MA, Jang D, Lee H, Burczak JD, Hu H, Sellors J, Tomazic-Allen SJ, Mahony JB. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in men and women by testing first-void urine by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1994;32:2682-5.
5. Dille, BJ, Butzen CC, Birkenmeyer LG. Amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:729-31.
6. Domeika M, Bassiri M, Mardh PA. Diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic males by testing urine by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:2350-2.
7. Schachter J, Stamm WE, Quinn TC, Andrews WW, Burczak JD, Lee HH. Ligase chain reaction to detect *Chlamydia trachomatis* infection of the cervix. *J Clin Microbiol*. 1994;32:2540-3.
8. Thomas BJ, MacLeod EJ, Taylor-Robinson D. Evaluation of a commercial polymerase chain reaction assay for *Chlamydia trachomatis* and suggestions for improving sensitivity. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1995;4:719-23.
9. Wiesenfeld HC, Uhrin M, Dixon BW, Sweet RL. Diagnosis of male *Chlamydia trachomatis* urethritis by polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis* 1994;21:268-71.
10. Palmer L, Falkow S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986;6:52-63.
11. Goessens WH, Kluytmans JA, den Toom N, van Rijsoort Vos TH, Niesters BG, Stolz E, Verbrugh HA, and Quint WG. Influence of volume of sample processed on detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:251-3.
12. Skulnick M, Chua R, Simor AE, Low DE, Khosid HE, Fraser S, Lyons E, Legere EA, Kitching DA. Use of the polymerase chain reaction for the detection of *chlamydia trachomatis* from endocervical and urine specimens in an asymptomatic low-prevalence population of women. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994;20:195-201.
13. Jensen, IP, Thorsen P, Moller BR. Sensitivity of ligase chain reaction assay of urine from pregnant women for *Chlamydia trachomatis*. *Lancet* 1997;349:329-30.
14. Taylor-Robinson D, Thomas BJ, Osborn MF. Evaluation of enzyme immunoassay (Chlamydiazyme) for detecting *chlamydia trachomatis* in genital tract specimens. *J Clin Pathol* 40;1987:149-9.
15. Bauwens JE, Clark AM, Loeffelholz MJ, Herman SA, Stamm WE. Detection of *Chlamydia trachomatis* urethritis in men by polymerase chain reaction on first-catch urine. *J Clin Microbiol* 1993;31:3013-6.
16. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Pickard L, Chong S, Jang D, Chernesky MA. Role of confirmatory PCRs in determining performance of *Chlamydia* Amplicor PCR with endocervical specimens from women with low prevalence of infection. *J Clin Microbiol* 1994;32:2490-3.
17. Miettinen A, Vuorinen P, Varis T, Hallstrom O. Comparison of enzyme immunoassay antigen detection, nucleic acid hybridization and PCR assay in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *Eur J Clin Microbiol* 1995;14:546-9.