

□ 원 저 □

임상 검체에서 결핵균 검출을 위한 항산성염색, PCR, LCR, PCR-Hybridization 검사법 간의 비교

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실, 내과학교실*

최종락, 임종백, 김형중*

= Abstract =

Comparison of Acid-Fast Staining, PCR, LCR, PCR-Hybridization for Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Clinical Specimens

Jong Rak Choi, M.D., Jong Baek Lim, M.D., Hyung Jung Kim, M.D.*

*Departments of Clinical Pathology and Internal medicine**

College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Background : Mycobacterial culture is a confirmatory test to detect *M. tuberculosis*, but it takes at least 6 weeks to diagnose. PCR is a rapid and sensitive method, but it is known that PCR has a high false positive rate due to contamination, and a high false negative rate due to inhibitors. It is also known that LCR and PCR-Hybridization, recently developed methods, are more specific methods than PCR in terms of detecting *M. tuberculosis*. In this study, we estimated the clinical utility of in house PCR, LCR and PCR-Hybridization for the detection of *M. tuberculosis*.

Methods : We evaluated 75 specimens, upon which *M. tuberculosis* culture based testing was requested, by PCR LCR, and PCR-Hybridization and compared results. Mycobacterial culture was performed on 3% Ogawa media for 8 weeks, and an in house PCR, LCx Mycobacterium tuberculosis assay kit (Abbott Laboratories, North Chicago, Ill) and the AMPLICOR *M. tuberculosis* test kit (Roche Molecular Systems, Inc. Branchburg, NJ, USA).

Results : In the view of the culture results, the sensitivities of the three tests were 40%, 80%, and 100% and

† 본 연구는 연세대학교 의과대학 1997년도 강사연구비에 의하여 이루어졌음. (과제번호 : 1997-39)

Address for correspondence :

Jong Rak Choi, M.D.

Departments of Clinical Pathology, College of Medicine, Yonsei University

Sinchon Dong 134, Seodaemun Gu, Seoul, Korea, 120-752

Phone : 02-361-5862 Fax : 02-364-1583 E-mail : cjr0606@yumc.yonsei.ac.kr

their specificities were 98.6%, 94.3%, and 94.3%.

Conclusion : LCR and PCR-Hybridization are rapid and sensitive methods for detecting *M. tuberculosis* in clinical laboratories. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 281-289)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Culture, PCR, Ligase chain reaction(LCR), PCR-Hybridization.

서 론

세계보건기구의 보고에 의하면 매년 800 만명의 새로운 결핵 환자가 발생되며 300 만명이 이로 인하여 사망한다¹⁻³. 결핵의 진단 방법으로는 전통적인 방법인 흉부 X-선 검사, 항산성 염색 및 결핵균 배양검사가 있으며 최근 중합효소 연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 이용하여 결핵균 DNA를 대량 증폭시켜 검출하는 방법이 있다⁴. 항산성 염색은 검사 결과를 신속하게 알 수 있으나 민감도가 낮아 결핵균 검출에 효율적이지 못하다⁵. 결핵의 확진 검사로 알려진 진균 배양 검사는 검체 당 10-100개의 균이 존재해야 가능하므로 비교적 소수의 균도 검출할 수 있을 뿐만 아니라 균종의 동종과 약제 감수성 검사도 동시에 가능한 장점이 있지만 배양에 최소한 6-8주 정도의 기간이 소요되어 결핵의 진단 및 치료가 지연되는 단점이 있다⁶. 최근 널리 사용되는 PCR 법은 검사 소요 시간이 짧아 결핵 환자의 조기진단이 가능하다^{7,8}. 그 후 PCR 법에 hybridization 방법으로 증폭산물을 확인하여 민감도와 특이도를 증가시키는 방법과 주로 요로감염을 유발하는 *Chlamydia trachomatis*나 *Neisseria gonorrhoeae*의 검출을 위해 개발된 ligase chain reaction(LCR)법^{9,10} 등 다양한 상품화된 방법이 사용되고 있다. 그러나 PCR 법은 carry-over에 의한 검체의 오염과 결핵을 치료하였을 때 죽은 균의 DNA에 의해서도 위양성을 보일 수 있으며, PCR법에 사용되는 Taq polymerase inhibitor에 의한 위음성을 보이는 문제점도 있다^{11,12}.

이에 저자들은 결핵균을 신속하게 진단할 수 있는 각 PCR, LCR, PCR-Hybridization 검사법을 항산성 염색 음성인 임상검체를 대상으로 결핵균 검출에

적용하여 배양법을 기준으로 민감도와 특이도를 구하고 그 임상적 유용성과 정도관리 등 결핵 검출의 표준화된 방법에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

1998년 8월 한달 동안 영동세브란스 병원을 방문하여 항산성 검사가 의뢰된 외래환자 및 입원환자 중 항산성 염색이 음성인 62명으로부터 75 검체를 채취하였다. 객담 59 검체, bronchial washing 6 검체, 흉막액 4 검체, 뇌척수액 2 검체, 소변 2 검체였고 복수, 기타 체액 1 검체씩이었다. 각각 PCR, LCR, PCR-hybridization 법을 시행하여 배양법을 기준으로 민감도와 특이도를 구하였다.

2. 항산성 도말 염색법

검체와 동량의 4% NaOH를 넣고 vortex로 충분히 섞은 후 실온에서 20분간 방치하여 오염을 제거하였고 3400 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물로 도말 슬라이드를 만들어 열판 위에서 고정시킨 후 Zeihl-Neelsen 항산성염색을 시행한 후 현미경으로 300시야 이상을 관찰하였다. 항산성 도말 염색법의 보고방법은 WHO 보고방법을 따랐다.

3. 배양법

항산성 도말 염색법에서와 같이 만들어진 검체 침전물을 3% Ogawa 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였

으며 1 주일 간격으로 관찰하여 8주간 배양 관찰하였다.

4. In house PCR

1) 검체로부터 DNA 추출하는 법

전 처리가 끝난 검체 100 μ L를 500 μ L의 세척액(tris-HCl solution with 1% solubilizer)에 가하여 12, 500 \times g에서 10분 동안 원심한 후 상층액을 버리고 100 μ L 용해액(1% solubilizer, 0.4% NaOH)을 가하여 60 $^{\circ}$ C에서 45분간 둔 다음 100 μ L의 중화용액(tris-HCl solution)을 가하였다.

2) DNA 증폭

시발체는 *M. tuberculosis*에 특이도를 보이는 IS6110 insertion sequence인 P1(5'-CCTGCGA-GCGTAGGCGTCGG-3')과 P2(5'-CTCGTCCA-GCGCCGC TTCGG-3')를 사용하여 증폭하였다. 반응 혼합액은 PCR 완충액(50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.3)에 dNTP 각 0.25 mM 씩 넣고 genomic DNA 2 μ L, Taq DNA polymerase 1 unit(Perkin-Elmer, Foster City, CA., USA)와 시발체 각 1 μ L를 넣어 총 용량이 20 μ L가 되도록 하였다. 이 혼합액을 GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer, Foster City, CA., USA)을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 처리한 후 다음 반응(94 $^{\circ}$ C에서 10초, 65 $^{\circ}$ C에서 10초, 72 $^{\circ}$ C에서 15초)을 35회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 연장처리 하였다.

3) 결과의 확인

9 μ L의 반응 산물에 loading dye 1 μ L를 섞어 1.5% agarose gel에서 전기영동하였으며 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 반응 산물을 확인하였다. Size marker는 100 bp ladder(Gibco, Grand Island, NY., USA)를 사용하여 크기를 비교하였다. 예상되는 반응 산물의 크기는

123bp이다.

5. LCR법

LCR 검사는 Abbott사의 LCx kit(Abbott Laboratories, North Chicago, Ill)를 사용하여 제조사에서 제공한 사용지침에 따라 시행하였다. 구체적인 검사 시행방법은 다음과 같다.

1) 검체 처리 방법

시약은 LCx kit내에 포함된 것을 사용하였다. 검체를 2-5초간 vortex한 후 0.5mL를 취하여 LCx respiratory specimen tube안에 넣어 1500 \times g로 실온에서 8-12분간 원심분리하여 상층액을 제거후 1mL의 LCx 검체부유완충액을 가하여 1,500 \times g로 다시 12분간 원심분리하였다. 상층액 제거후 0.5mL의 완충액으로 균부유액을 만들었다.

2) 비활성화 과정 및 DNA 분리방법

미리 가열된 heating-block에서 95 $^{\circ}$ C, 20분간 처리하여 비활성화 시킨 후 실온에서 10분간 방치한 다음 초음파 분쇄기(Abbott LCx Lysor)을 이용하여 결핵균의 DNA를 분리하였다.

3) 증폭 및 검출과정

각각 10¹¹ molecule/reaction 이상되는 4개의 oligonucleotide probe, 1unit 열내성 DNA polymerase, 14,000 unit 이상의 열내성 DNA ligase, 각각 3 M 이상의 두 dNTPs, 15 M 이상의 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)가 들어 있는 반응혼합물(MTB amplification vial) 100 M에 DNA 추출물 100 M을 가하여 94 $^{\circ}$ C에서 1초, 64 $^{\circ}$ C에서 1초, 69 $^{\circ}$ C에서 40초로 37주기를 Perkin-Elmer 9600(Perkin-Elmer Medical Instruments, Pomona, Calif)을 이용하여 증폭시켰으며 매 실시 때마다 양성 대조와 음성 대조를 같이 실시하였다. 증폭된 산물은 LCx analyzer를 이용하여 anti-capture haptent

(rabbit)으로 coating된 microparticle sandwich EIA 법으로 검출하였다.

6. PCR-hybridization

모든 재료는 Roche사의 AMPLICOR *M. tuberculosis* test kit(Roche Molecular Systems, Inc. Branchburg, NJ, USA) 내에 포함된 것을 사용하였고 전 과정은 제조회사의 지시에 따라 시행하였는데 아래의 4단계로 나누어 실시하였다.

1) 검체로부터 DNA 추출하는 법

전 처리가 끝난 검체 100 μ L를 500 μ L의 세척액(tris-HCl solution with 1% solubilizer)에 가하여 12, 500 \times g에서 10분 동안 원심한 후 상층액을 버리고 100 μ L용해액(1% solubilizer, 0.4% NaOH)을 가하여 60 $^{\circ}$ C에서 45분간 둔 다음 100 μ L의 중화용액(tris-HCl solution)을 가하였다.

2) DNA 증폭

추출된 DNA의 증폭은 COBAS Amplicor™ (Roche Molecular Systems, Inc. Branchburg, NJ, USA)을 이용하였고 반응혼합물을 AmpliTaq(Taq polymerase), biotin이 부착된 시발체, nucleotides, uracil-N-glycosylase (AmpErase : Roche Molecular Systems, Inc.) 등으로 구성되어 있다. 반응 혼합물 50 μ L가 들어있는 시험관에 DNA추출이 된 검체 50 μ L를 가하여 98 $^{\circ}$ C에서 20초간 2주기 열변성(denaturation)하고 62 $^{\circ}$ C에서 20초간 결합(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 연장(extension)시킨 다음 94 $^{\circ}$ C 20초, 62 $^{\circ}$ C 20초, 75 $^{\circ}$ C 45초로 35주기를 증폭시켰으며 검사 때마다 양성 및 음성 대조를 포함시켰다. 중합효소연쇄반응에 사용한 시발체는 Mycobacterium의 16S ribosomal RNA의 conserved region에 있는 genus specific DNA region으로 584 bp였으며 이미 증폭된 반응산물의 오염으로 인한 위양성을 막기 위해서 AmpErase를 반응 혼합

물에 첨가하였다.

3) Hybridization

증폭이 끝난 후 100 μ L의 denaturation solution(1.6% NaOH)을 가하여 실온에서 10분간 방치한 다음 25 μ L를 취하여 hybridization solution(sodium phosphate solution with <0.2 solubilizer and <25% chaotrope) 100 μ L가 들어 있는 microplate에 가한다. 각 well에는 *M. tuberculosis* DNA에 특이한 oligonucleotide 소식이 부착되어 있어서 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 방치하면 biotin이 부착된 반응산물이 plate에 포착된다.

4) 반응산물의 검출

hybridization이 끝난 plate를 buffer로 세척하여 부착되지 않은 증폭산물을 제거한 다음 avidin-horse-radish peroxidase conjugate를 가진 용액 100 μ L를 각 well에 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치한다. 부착되지 않은 conjugate를 제거하기 위해 buffer로 세척하고 기질(H₂O₂)과 발색체(tetramethylbenzidine)가 들어있는 용액 100 μ L를 가한 다음 10분 후에 100 μ L의 stop solution(4.9% sulfuric acid)을 가하여 반응을 정지 시킨다. Microwell plate reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하고 0.35 이상의 흡광도를 가진 검체를 양성으로 판정하였다.

결 과

각 검사법간의 특징과 차이는 Table 1에 간단히 비교하였으며, 검사 결과 항산성 염색 음성인 75 검체 중 항산균 배양 양성인 검체는 5 검체였고 음성인 70 검체였다. In house PCR에서는 항산균 배양양성 5 검체 중 2 검체가 PCR양성이었고 3 검체는 PCR 음성이었다. 배양음성 70 검체 중 PCR 양성인 검체는 1 검체였다. LCR에서는 배양양성 5 검체 중 4 검체가 양성되었고 배양음성인 70 검체 중 LCR 양성은

Table 1. Summary of the characteristics of in house PCR, LCR, PCR-hybridization

Characteristics	In house PCR	LCR	PCR-Hybridization
Target	IS6110	Protein antigen B	16s rRNA
Sample preparation	Chemical kill : heat lysis	Heat kill : sonic lysis	Chemical kill: heat lysis
Detection	EP, ethidium bromide	MEIA, Anti-capture hapten	Av-HRP, TMB
Carry over		Chelating metal complex	Uracil-N-glycosylase
Q.C.			
Positive control	+	+	+
Negative control	+	+	+
Internal control			+

Table 2. Comparison of in house PCR, LCR, PCR-hybridization to culture results in 75 specimens of AFB stain negative

Test	Culture for <i>M. tuberculosis</i>		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Positive	Negative		
In house PCR				
Positive	2	1	40	98.6
Negative	3	69		
LCR				
Positive	4	4	80	94.3
Negative	1	66		
PCR-hybridization				
Positive	5	4	100	94.3
Negative	0	66		

4 검체였다. 그리고 PCR-Hybridization에서는 배양 양성 5 검체 모두에서 PCR-Hybridization 양성이었고 배양음성 70 검체 중 4 검체에서 PCR-Hybridization 양성이었다. In house PCR, LCR, PCR-Hybridization의 민감도는 각각 40%, 80%, 100% 였고, 특이도는 각각 98.6%, 94.3%, 94.3% 였다 (Table 2).

항산균 배양, in house PCR, LCR 및 PCR-Hybridization의 결과가 일치하지 않는 검체는 7 검

체였다. 항산균 배양과 PCR-Hybridization 양성인 검체 1개였고 LCR 및 in house PCR 음성인 검체가 1개였고 항산균 배양음성이면서 in house PCR, LCR, PCR-Hybridization 양성인 검체가 1 개였다. 항산균 배양, LCR, PCR-Hybridization 양성인 검체 1개였고 in house PCR음성인 검체가 2개였고 항산균 배양과 in house PCR음성이면서 LCR 혹은 PCR-Hybridization 양성인 검체가 3개였다 (Table 3).

Table 3. Comparison of in house PCR, LCR, PCR-hybridization and culture results in 75 specimens of AFB stain negative

In house PCR	LCR	PCR-hybridization	Culture	No. of specimens
-	-	+	+	1
+	+	+	-	1
-	+	+	+	2
+	+	+	+	2
-	+	+	-	3
-	-	-	-	66
				75

고 찰

결핵은 전세계적으로 가장 중요한 전염성 질환의 하나로 우리나라의 경우 1980년대 이후 결핵이 감소하는 추세를 보이고 있지만 1995년 통계에 의하면 결핵환자의 유병율은 인구 10만명 당 1,032명이고 결핵배양 양성인 사람도 인구 10만명 당 219명으로 아직까지 매우 흔한 전염성 질환의 하나이다¹³. 최근 후천성 면역결핍증(AIDS) 환자와 같이 면역기능의 감소를 보이는 환자가 증가하고 다제 내성 균주로 인한 결핵이 증가하고 있어 보다 빠르고 정확한 진단방법이 절실히 필요한 상황이다^{14, 15}.

최근 결핵을 신속하고 정확하게 진단하기 위해서 분자유전학적 검사법들이 많이 사용되고 있는데 DNA 탐침을 이용한 방법(Gen-probe), restriction fragment length polymorphism(RFLP), PCR, Southern blot 등이 흔히 사용된다. 이 중 PCR은 1989년 Brisson 등¹⁶이 *Mycobacterium species*의 특이 단백질인 65 kilodalton을 encoding 하는 DNA중 일부인 383 염기서열을 시발체로 사용한 이후 여러 종류의 PCR법과 시발체가 개발되어 많은 검사실에서 사용하고 있다. 하지만 PCR법의 예민도와 특이도는 55-100%, 62-100%로 보고자마다 다양하고^{7, 8} 반응산물의 오염과 죽은 결핵균으로 인한 위양성율이 77%에 달한다는 보고도 있어 표준화된 PCR법의 protocol이 필요한 실정이다¹⁷.

최근 개발된 LCR법은 PCR법과 마찬가지로 증폭하고자 하는 DNA 일부에 대해 상보적 염기서열을 갖는 4개의 시발체를 사용하여 증폭과정을 거친 뒤 열내성 연결효소(ligase)가 반응하여 nucleotide 끝들을 서로 연결시켜 시발체들이 목표 DNA와 상보적으로 결합하는 방법을 이용하는 방법으로 단일 염기쌍의 차이도 검출할 수 있는 효과적인 방법이다¹⁸. *Mycobacterium tuberculosis*인 경우 Enrico 등¹⁹은 결핵으로 최종 진단 받은 환자들의 호흡기 검체와 비호흡기검체를 포함한 LCR법에서 예민도가 89.36%로 배양법 82.98%, 도말법 78.72%보다 우수하였다고 보고하였다.

Amplicor *M. tuberculosis* kit을 이용한 PCR-Hybridization은 DNA를 추출하는 과정이 하나의 시험관 내에서 이루어지기 때문에 검체간의 오염을 줄일 수 있고 증폭전에 검체에 AmpErase(uracil N-glycosylase)를 첨가하여 오염된 반응 산물로 인한 위양성을 최소화한 방법이다. Beavis 등²⁰은 객담검체에서 PCR-Hybridization을 이용하여 항산균을 검출할 때 민감도와 특이도가 95%, 96%였다고 보고하였다.

본 연구에서 결핵의 확진법인 결핵균 배양법을 기준으로 판단할 때 in house PCR, LCR법 및 PCR-Hybridization의 민감도는 각각 40%, 80%, 100%로 in house PCR법이 특이하게 낮았고 LCR법과 PCR-Hybridization은 다른 보고자들과 비슷한 결과

를 보였다. 하지만 결핵균 배양양성이 5검체로 매우 작아서 배양양성 검체가 많을 경우 in house PCR의 경우 민감도가 향상될 것으로 생각된다. 세가지 검사 모두에서 특이도는 98.6%, 94.3%, 94.3%로 모두 우수한 결과를 보였으며 다른 보고자들의 결과와 비슷하였다.

각각의 검사에서 상이한 결과를 보인 경우가 7예였다. 항산균 배양과 PCR-Hybridization 양성이면서 LCR 및 in house PCR 음성인 검체가 1개였다. 이 경우 비슷한 시기에 동일 환자의 동일 검체를 이용하여 재검한 결과 항산균 배양, LCR, PCR-Hybridization에서 양성이었으며 in house PCR에서 음성을 보여 in house PCR과 LCR의 위음성으로 생각된다. 항산균 배양음성이면서 in house PCR, LCR, PCR-Hybridization 양성인 경우가 1예였다. 이 경우 분자유전학적 검사를 시행하기 전 외래방문 시 시행한 항산성 염색법과 배양검사서 양성이어서 이미 결핵약을 투약 받았던 환자로 죽은 결핵균으로 인해 분자유전학적 검사에서 양성으로 나온 것으로 생각된다. 항산균 배양, LCR, PCR-Hybridization 양성이면서 in house PCR음성인 검체가 2개였다. 이 2예 모두에서 항산균 배양이 7주 이후에 1+ 정도로 나와 검체 내의 결핵균의 수가 작았던 것으로 판단되며 따라서 in house PCR의 위음성으로 생각된다. 항산균 배양과 in house PCR음성이면서 LCR, PCR-Hybridization 양성인 경우가 3예였다. 이 중 1예는 기관지 내 결핵으로 객담 배양검사에서는 음성으로 나왔으며 기관지 세척액 배양검사에서는 8주이후에 양성이었던 경우였고 다른 1예는 과거력상 결핵으로 진단 받았던 환자로 결핵약을 계속해서 복용하였던 환자였으며 나머지 1예는 진단명이 골수이형성증후군 및 당뇨병으로 환자의 면역상태가 저하된 상태여서 배양검사서 음성이었지만 결핵 발병여부에 대한 추적관찰이 필요한 예로 생각된다.

이상의 결과에서 LCR법과 PCR-Hybridization은 결핵균 검출에 있어 우수한 민감도와 특이도 보여 신속하게 진단할 수 있어 결핵의 조기진단에 유용할 것

으로 사료되며 in house PCR의 경우 민감도가 검체 수를 늘려 평가할 경우 민감도가 향상될 것으로 생각된다.

요 약

배 경 :

결핵의 진단에 있어 결핵균 배양검사는 결핵의 확진 검사이지만 배양에 최소한 6-8주가 소요되어 진단 및 치료가 지연되는 단점이 있다. PCR법은 신속하고 예민하게 결핵균을 검출할 수 있지만 위양성율과 위음성율이 높아 문제시 되고 있다. 최근에 개발된 LCR법과 PCR-Hybridization은 PCR법 보다도 민감하게 결핵균을 검출할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이에 저자들은 항산균 배양을 기준으로 in house PCR, LCR 및 PCR-Hybridization 각각의 임상적 유용성을 알아보고자 한다.

방 법 :

1998년 8월에 결핵진단을 위해 세브란스 병원 임상병리과에 의뢰된 75검체를 대상으로 AFB 도말 염색 검사, 결핵균 배양 검사(3% Ogawa 배지, 8주간), in house PCR, LCR(Abbott LCx kit) 및 PCR-Hybridization을 시행하여 각각의 민감도와 특이도를 평가해보았다.

결 과 :

항산균 배양법을 기준으로 판단할 때 in house PCR, LCR(Abbott LCx kit) 및 PCR-Hybridization의 민감도는 각각 40%, 80%, 100%였고 특이도는 98.6%, 94.3%, 94.3%였다.

결 론 :

LCR법과 PCR-Hybridization은 결핵균 검출에 있어 우수한 민감도와 특이도를 보여 결핵의 조기진단에 유용할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. WHO Report : TB A Global Emergency. Geneva,

- Switzerland : World Health Organization 1993.
2. Sudre P, Ten DG, Koch A. Tuberculosis : A global overview of the situation today. *Bull World Health Organ.* 1992;70:149-59.
 3. Koch A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;72:1-6.
 4. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91
 5. Schluger NW, Rom WN. Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:264-7.
 6. Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y. Comparison of MB-check, BACTEC and egg-based media for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30:878-81.
 7. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, van Leeuwen J, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1994; 32:672-8.
 8. 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* 1994;32:393-7.
 9. Bassiri M, Hu HY, Domeika MA, Burczak J, Svensson LO, Lee HH, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from women by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1995;33:898-900.
 10. Smith KR, Ching S, Lee H, Ohhashi Y, Hu H, Fisher III HC, et al. Evaluation of ligase chain reaction for use with urine for identification of *Neisseria gonorrhoeae* in females attending a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 1995;33:455-7.
 11. Thornton CG, Hartley JL, Rashtchian A. Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR : characterization of residual UDG activity following thermal cycling. *Biotechniques* 1992;13:180-3.
 12. Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990;28:1877-1880.
 13. 보건사회부, 대한 결핵 협회. 제7차 전국 결핵 실태조사 결과. Seoul : 1995.
 14. Centers for Disease Control. National action plan to combat multidrug-resistant tuberculosis : meeting the challenge of multidrug-resistant tuberculosis : summary of a conference : management of persons exposed to multidrug-resistant tuberculosis. *MMWR* 1992;41:5-8.
 15. Centers for Disease Control. Recommendations made on reducing tuberculosis rates. *CDC AIDS weekly* Jan 1991:28:8.
 16. BrissonNoel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989;11:1069-71.
 17. Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PEM, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* : a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994;32:277-84.
 18. Wiedman M, Czajka C, Wilson W, Luo L, Barany F, Batt CA. LCR-overview and applications. *PCR Methods Appl* 1994;3:551-64.
 19. Enrico T, Federica L, Simonetti MT. Evaluation

of a commercial ligase chain reaction for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1997;35:2424-6.

20. Beavis KG, Lichty MB, Jungkind DL, Giger O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2582-6.