

중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 이용한 골관절 결핵의 진단

계명대학교 의과대학 정형외과학교실, 임상병리학교실*, 병리학교실** 및 의과학 연구소

민병우, 이길호, 전효진*, 이상숙**, 김상표**

-Abstract-

Use of Polymerase Chain Reaction for Identification of Mycobacterium Tuberculosis in Bone and Joint

Byung Woo Min, M.D., Kil Ho Lee, M.D.,
Hyo Jin Jeon, M.D.* , Sang Sook Lee, M.D,**
Sang Pyo Kim, M.D.**

Department of Orthopedic Surgery, Department of Clinical Pathology, Department of Pathology,
Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science, Taegu, Korea.

A presumptive diagnosis of tuberculosis in bone and joint can be made on the basis of patient's history, clinical and radiologic findings, and the presence of AFB in the patient's specimen. Microscopic examination by Ziehl-Neelsen stain for AFB is the most rapid method for detection of *M. tuberculosis*, but it is insensitive and nonspecific. Laboratory cultures of *M. tuberculosis* are cumbersome and time consuming. For that reason, the development of a more rapid method to diagnose the tuberculosis of bone and joint is highly desirable. We have utilized PCR method in order to detect *M. tuberculosis* and compared with conventional smear and culture method. We used 30 paraffin block specimens of clinically and pathologically suspected bone and joint tuberculosis between 1992 and 1994. The results were as follows:

1. The sensitivity of IS986, nested-PCR method under the condition of this experiment was 0.5 fg.
2. Seven (23.3%) out of thirty biopsy specimen were positive by AFB stain.
3. By PCR method, 19(63.3%) of the 30 paraffin-embedded biopsy specimens were positive for *M. tuberculosis* DNA. 10(43.5%) of 23 AFB-negative cases were positive for *M. tuberculosis* DNA. Six(85.7%) of seven AFB-positive biopsy specimens and four(57.1%) of seven AFB-positive pus material were positive for *M. tuberculosis* DNA.
4. By PCR method, 10(58.8%) out of 17 AFB negative cases in biopsy specimen and pus material were positive for *M. tuberculosis* DNA.
5. By pus-AFB stain, sensitivity were 20%, specificity were 70% ; by biosy-specimen-AFB stain, sensitivity 27.2%, specificity 87.5% ; by PCR method, sensitivity 70%, specificity 41%.

The PCR results in paraffin-embedded specimen were found to have higher positive rate than AFB stain. These findings suggest that DNA amplification by PCR may be used for direct detection of *M. tuberculosis* from clinical fresh and paraffin embedded tissue specimens. The PCR is an especially useful technique in the demonstration of mycobacterial DNA fragments in patients with clinically suspected tuberculosis, showing acid fast bacilli stain-negative granulomatous lesion, microscopically.

Key words : Tuberculosis, Bone and joint, Polymerase chain reaction(PCR).

서 론

한국에서 1990년 현재 X-ray 검사상 증명된 활동성 결핵의 유병율이 1.84%로서 환자수로는 728,000명에 이르는 것으로 추산된다(보건사회부, 1992).

따라서 우리나라와 같이 결핵의 유병율이 비교적 높고 부적절한 치료로 인해 재발율이 매우 높은 나라에서는 보다 신속하고 특이도와 민감도가 높은 결핵진단검사의 필요성이 절실하다고 하겠다.

아울러 정형외과 영역에서 문제가 되는 골관절 결핵도 대부분의 경우 폐나 임파절등의 타장기에 속발성으로 발생하여 병변이 매우 서서히 진행하여 임상증세가 뚜렷해지기 이전에 이미 상당한 진행을 보이므로 X-ray상 조기에 발견하기가 어렵고, 치료가 지연되는 경우가 많다(윤홍식 외, 1984). 골관절 결핵의 치료에 있어서 중요한 것은 정확한 진단아래 적절한 항결핵제 사용이나 수술치료가 요구된다. 결핵을 진단하는데 흔히 사용하는 결핵균 도말법은 신속간편하나 그 특이도 및 민감도가 낮고(Hermans et al, 1990; Cormican et al, 1992) 결핵균 배양법은 특이도 및 민감도는 비교적 높으나 오랜 시일(평균 3-6주)을 요한다(Sjöbring et al, 1990; Cormican et al, 1992; Chiyoji et al, 1993; Perosio & Frank, 1993).

그 외 방사선 동위원소를 사용하는 BACTEC system(Ellner et al, 1988), 단클론 항체에 의한 효소 면역법(박영길 외, 1990; Schöningh et al, 1990) 및 DNA 표지자(probe)에 의한 보합결합등이 시도되었으나(Schoemaker et al, 1985; Ellner et al, 1988) 비싼 검사비와 복잡한 검사방법 때문에 좋은 성과를 거두지 못하여(현정애, 1993) 보다 단순화되어 신속한 결과를 보고할 수 있고 경제적이며 예민도가 높은 결핵균 검출로 빠른 시간 내에 결핵을 진단할 수 있는 진단방법이 요구되고 있다.

이에 최근 유전자 기술의 진보로 결핵균의 여러 항원들의 유전자가 클론화되고 그 염기 배열이 밝혀졌으며 목적으로 하는 DNA만을 시험관내에서 대량으로 증폭할 수 있는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR)방법이 개발되어 결핵균에 특이한 DNA의 증폭에 의하여 결핵균의 존재를 확인하는 연구가 진행되고 있는 바(조상래 외, 1990; Hermans et al, 1990; Sjöbring et

al, 1990; Wit et al, 1990; Cormican et al, 1992; Chiyoji et al, 1993; Perosio & Frank, 1993; Popper et al, 1994), 저자들은 골관절 결핵의 확진을 위하여 임상적으로나 병리조직학적 결핵이 의심되는 환자의 가검물에서의 파라핀 포매조직을 대상으로 PCR에 의한 결핵균 검출을 시도하였다.

연구대상 및 방법

저자들은 임상증상, 방사선 소견 및 검사소견 등을 근거로 골관절결핵이 의심되어 1992년 6월부터 1994년 6월까지 병리조직 검사가 의뢰된 30례의 임상검체와 음성대조군으로 만성골수염이 의심되어 검사의뢰된 10례의 임상검체를 대상으로 하여 생검조직과 병소부 농가검물로써 결핵균 도말법을 실시하고 파라핀 포매조직으로서 결핵균 PCR을 실시하여 결과를 비교분석 하였다.

결핵이 의심되었던 30례의 이환 부위는 척추에서 소파술을 시행한 경우가 17례로 가장 많았고, 슬관절부 3례, 천장관절부 및 고관절부가 각각 2례, 족관절부, 수근관절부, 치골부, 늑골부, 족부 및 경골부가 각각 1례였다. 대상군 10례중 군도말상포도상구균이 4례, *Pseudomonas*균이 3례, 균이 음성인 경우가 3례였으며, 병리조직소견상 만성 골수염으로 진단된 파라핀 포매조직을 이용하였다. 이환 부위는 척추부 및 경골부가 각각 3례, 고관절부 2례, 슬관절부 및 수근관절부가 각각 1례이었다.

저자들이 이용한 PCR법은 PCR 과정의 전 단계인 DNA 분리과정으로 proteinase K-treated법으로 실시하였다. Proteinase K-treated법에 의한 DNA 분리는 파라핀 포매된 생검조직을 7 μm 두께로 잘라 3-4조각을 1.5 mL Eppendorf-tube(E-tube)에 넣었다. 각 tube에 xylene 1.0 mL를 가한 후 실온에서 30분동안 진탕하고 18°C에서 10분동안 15000 rpm으로 원침과정을 3회 반복후 침사에 100% ethanol 1.0 mL 가한후 18°C에서 10분 동안 15000 rpm으로 원침과정을 2회 반복하였다. 침사를 56°C에서 30-40분동안 말린 후 10 mg/mL proteinase K(*Tritirachium album*) 2 μL 와 digestion buffer[50 mM Tris(pH 8.5) 1 mM ethylenediaminetetraacetate(EDTA), and 0.5% Tween 20]100 μL 로 재부유한 후 밤동안 37°C에서 water bath에 방치하였다. 30초동안 spin down후 9분 동안 water bath에서 끊임 후 다시 30초동안 spin down후 상층액

을 취하여 바로 PCR를 시행하거나 -20°C에서 보관한 후 실험에 사용하였다.

공시균주는 Sauton배지에 2-3주간 배양한 후 수집하여 염색체 DNA를 bead-beating법으로 분리한 다음 Tris-EDTA 용액(1 mM Tris, pH 8.0, 0.01 mM EDTA, 이하 TE용액)으로 각각 5 pg/ μ L가 되도록 조정하여 각 PCR법의 특이도를 조사하기 위한 표적 DNA로 사용하였다. *M. tuberculosis* H37Rv DNA는 다시 500 fg/ μ L, 50 fg/ μ L, 5 fg/ μ L 0.5 fg/ μ L 및 0.05 fg/ μ L가 되도록 계단회석하여 각 PCR법의 예민도를 조사하였다 (Fig 1).

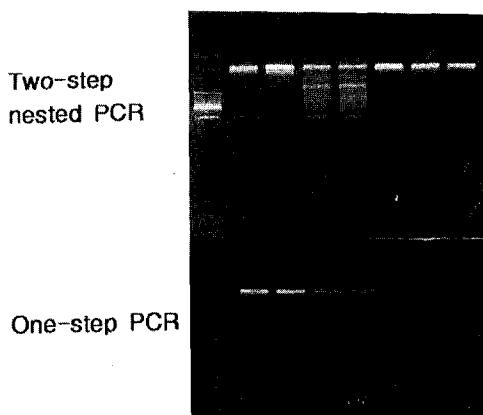


Fig. 1 Sensitivity between the two-step nested PCR of insertion element and one-step PCR with purified DNA of *M. tuberculosis*.

* SM : repeats of a 100-bp fragment as a size marker.

PCR 과정은 FTC 2000(대한메디칼 주, 한국)을 사용하여 IS986 insertion element의 INS1(5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC)과 INS2(5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA)바깥 시발체와 Pt3 (5'-GAACGGCTGATGACCAACT)와 Pt6 (5'-ACGTAGGCGAACCTGCCCA)의 안쪽 시발체로서 이단계 nested-PCR(이하 IS986법)을 실시하였으며, 반응혼합물의 성분 및 농도를 조정한 다음, predenaturation을 94°C에서 10초간 실시하고, 변성(denaturation)을 94°C에서 1초, 결합(annealing)을 55°C에서 20초 및 연장(elongation)을 72°C에서 10초동안 40회 반복해서 실시한 다음 INS1과 INS2로써 postelongation을 72°C에서 20초간 일차 PCR을 실시하고, 이차 PCR은 Pt3와 Pt6로써 일차 PCR 산물을 표적 DNA로 하여 나머지는 일차 PCR과 동일한 조건에서 증폭하였다. PCR

산물의 분석은 15% agarosegel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 188 bp의 특이 증폭 산물의 띠를 관찰하였다(Fig 2).

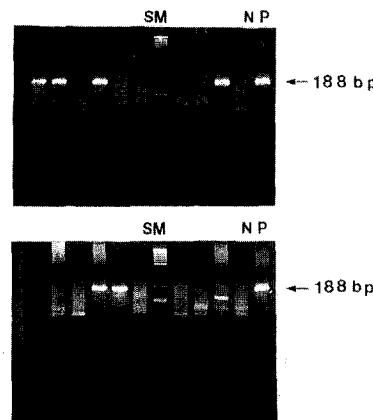


Fig. 2 Representative results of PCR amplification of paraffin embedded specimens. The amplification products were analyzed on 1.5% agarosegels stained with ethidium bromide.

* SM : repeats of a 100-bp fragment as a size marker.

* N : negative control.

* P : positive control.

결과

PCR의 민감도는 계단회석한 *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 표적 DNA로 하여 IS986법으로 실시한 결과 0.5 fg 이상에서 양성반응을 보였다.

결핵이 의심된 30례의 파라핀 포매조직에서 PCR법에 의해 19례(63.3%)에서 결핵균을 검출할 수 있었고, 생검조직에서 시행한 결핵균 도말법상 양성반응을 보인 7례(23.3%)중 6례에서 PCR양성 반응을 보였다. 병소부 농가검물에서 시행한 결핵균도말상 양성반응을 보인 7례중 4례에서 PCR 양성반응을 보였으며, 이중 1례에서 병소부 농가검물과 생검조직에서 동시에 결핵균 도말법상 양성 반응을 보였다. 생검조직 및 병소부 농가검물에서 시행한 결핵균 도말법상 음성 반응을 보였던 17례 중 10례(58.8%)에서 PCR 양성반응을 보였다. 음성 대조군으로 사용하였던 10례에서는 모두 PCR 음성반응을 보였다(Table 1). 본 실험에서는 임상증상, 방사선 소견과 검사소견을 근거로 하여, 병소부 농가검물과 생검조직에서 시행한 결핵균 도말

Table 1. Result of AFB stain and PCR for *M. tuberculosis*

Biopsy specimen	AFB stain	Number of cases		TOTAL
		Pus	PCR	
+	+	1	-	1
+	-	5(83.3%)	1(16.7%)	6
-	+	3	3	6
-	-	10(58.8%)	7(41.2%)	17
TOTAL		19(63.3%)	11(36.7%)	30

법 및 파라핀 포매조직으로서의 PCR법 중 한가지라도 양성반응이 나타난 경우인 23례를 결핵성 판절염으로 진단하였다.

위의 결과로 병소부 농가검물에서 시행한 결핵균 도말법에서 민감도는 20%, 특이도는 70%였으며, 생검조직의 결핵균 도말법상 민감도는 27.2%, 특이도는 87.5%, 파라핀 포매조직으로서 결핵균 PCR법 상 민감도는 70% 특이도는 41%로 나타났다.

고 찰

한국에서 1990년 현재 X-ray상 증명된 활동성 결핵의 유병률은 1.84%로 보고되고 있으며⁵ 세균학적 검사로 증명된 결핵의 유병률은 0.24%이고 직접도말법에 의한 항산성 염색법으로 증명된 유병률은 0.14%에 불과해 결핵의 진단에는 어려움이 많다(현정애, 1993). 폐외 결핵(extrapulmonary tuberculosis)이 전체 결핵의 10~15%이고, 그 중 약 10%정도가 골관절 결핵으로써 골관절 결핵은 전체 결핵의 약 1~3%를 차지한다(대한정형외과학회, 1993).

최근 여러 가지 항결핵제와 적절한 화학요법의 개발로 그 이환율이 감소되어 골관절 결핵은 감소 추세이나 아직 한국을 비롯한 몇몇 나라에서는 정형외과영역에서 상당수 골관절 결핵을 보고하고 있다.

윤홍식등(1984)은 정형외과에 내원한 총 신환자의 1.44%가 골관절 결핵 환자였다고 보고하였고 외국의 경우 Davidson과 Horowitz (Davidson & Horowitz, 1970)은 전체 결핵 환자의 1%를 차지한다고 하였다. 이러한 골관절 결핵시 병변이 매우 서서히 진행하여 임상증세가 뚜렷해지기 이전에 질병자체는 이미 상당히 진행되는 것이 보통이어서 X-ray상 조기에 발견하기 어렵고, 특히 관절 결

핵시 조기에 진단되어 치료된다면, 만족할 만한 판절기능을 기대할 수 있으나 불행하게도 진단이 지연되거나 오진을 하는 경우가 많아 불구를 초래하는 경우가 많으므로 보다 정확한 조기 진단이 절실히 요구되는 바이다.

기존의 결핵균 도말법은 신속하고 간편한 결핵 진단검사법이나 이방법은 특이도가 낮고 검체 1ml당 결핵균의 수가 1×10^4 개 이상일 때 검출이 가능하므로 예민도는 매우 낮으며(Sjöbring et al, 1990; Chiyoji et al, 1993) 결핵균 배양법은 검체 당 10~100개 이상의 균이 생존해 있어야 양성 배양이 되며 비교적 예민도가 높은 방법이기는 하나 배양기간이 3~6주가 소요되어(Sjöbring et al, 1990; Cormican et al, 1992; Chiyoji, 1993; Perosio & Frank, 1993) 임상적인 측면에서 볼 때 결핵치료에 이용되기는 많은 어려움이 있다.

병리조직학적 검사방법도 생검조직을 이용한 특징적인 병리조직 소견으로 Langhans 거대세포 주위에 유상피세포 및 임파구의 침윤을 보이는 결핵 결절형성 및 건락성 괴사(caseation necrosis)를 보이고 동시에 결핵균 도말법상 양성반응을 보이면 결핵으로 진단된다.

그러나 결핵균 도말법상 음성반응을 보이면서 특징적인 병리조직 소견만 보일 때는 결핵으로 확진하지 못하며, 매독, 방사선균증(actinomycosis)등의 진균증 및 유육종증(sarcoidosis)에서도 Langhans 거대세포와 유사세포가 나타날 수 있고, 류마トイ드 결절에서 보이는 섬유소양 변성(fibrinoid degeneration)이나 매독에서의 고무종(gumma) 건락성 괴사와 감별을 요하는 등(대한정형외과학회, 1993) 결핵으로 확진하기에는 어려운 단점이 있다.

기존의 결핵균 도말법, 배양법 및 조직학적인 검사법등의 단점을 보완할 수 있는 진단법으로 최근 PCR의 개발로 폐결핵에 대한 결핵균 검출의 시도

는 국내외적으로 활발하게 이루어지고 있으나(조상래 외, 1990; Hermans et al, 1990; Sjöbring et al, 1990; Wit et al, 1990; Cormican et al, 1992; Perosio & Frank, 1993; Popper et al, 1994), 폐의 결핵인 골관절 결핵에 대해서는 그 연구가 미미한 실정이다.

폐 결핵에 대해 PCR을 이용한 결핵균 검출 시도는 여러 저자들에 의해 시도되었는데, Perosio 와 Frank(Perosio & Frank, 1993)는 임상적으로 폐결핵이 의심된 25례의 파라핀 포매된 폐 생검가검물에서 16례의 PCR양성을 보고하였고, PCR 양성반응을 보인 16례 중 15례에서 결핵균 배양검사 양성반응을 보였다. 또한 Popper 등(Popper et al, 1994)은 결핵균 도말법에 양성반응을 보인 7례의 파라핀 포매 폐생검 가검물에서 모두 PCR 양성반응을 보고하였다. 또한 조상래 등(1990)에 의하면 결핵균 배양검사가 의뢰된 105건의 가검물을 대상으로 65례에서 결핵균 배양검사상 양성 반응을 보였고, 65례 중 64례(98.5%)에서 PCR 양성 반응을 보였다. Folgueira 등(Folgueira et al, 1993)은 PCR양성반응을 보였던 75례의 가검물 중 71례에서 결핵균 배양검사 양성반응을 보였고, 48례에서 결핵균 도말검사상 양성반응을 보였다고 보고하였다.

저자들의 경우 생검조직을 대상으로 시행한 결핵균 도말법 및 PCR법상의 양성을은 각각 30례 중 7례(23.3%) 및 30례 중 19례(63.3%)였으며, 결핵균 도말법상 양성반응을 보인 7례 중 6례(85.7%)에서 PCR 양성반응을 보였다.

생검가검물 및 병소부 농가검물에서 결핵균 도말법상 음성반응을 보인 23례 중 10례(43.5%)에서 PCR 양성반응을 보였다. 결핵균 도말법상 생체조직가검물에서는 음성반응을 보이고 농가검물에서 양성 반응을 보였던 6례 중 3례에서만 PCR양성반응을 보였는데 이 결과는 가검물체취부위의 상이성과 농가검물을 이용한 PCR법을 시행치 않았기 때문으로 생각되며, 만약 당시에 6례의 농가검물을 대상으로 PCR법을 시행하였다면 높은 PCR 양성 반응율을 보였을 것으로 생각된다.

임상가검물에 대해 결핵균 배양검사를 시행치 않은 미비점은 있으나 생검가검물 및 병소부 농가검물에서 결핵균 도말법상 음성반응을 보인 23례 중 10례(43.5%)에서 PCR양성반응을 보여 결핵이 의심되는 환자의 있어서 생검가검물 및 병소부 농가검물에서 결핵균 도말법상 음성반응을 보이는 경우 PCR법을 시행함으로써 결핵균 검출에 있어 많은 도움을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

저자들이 사용한 PCR은 proteinase K-treated법을 이용해 DNA를 검출하고 1S986법으로 PCR을 실시함으로써 검체에 포함된 결핵균 1개까지 분리할 수 있는 예민도를 가진다.

PCR법의 단점은 살아있는 결핵균과 죽은 것들의 구별이 어려워 환자를 치료하여 균 배양에서 음성이 나온 후에도 PCR에서 양성으로 나오는 경우와 같이 치료기간의 결정등에 있어서 약간의 문제점이 있으나 가검물에 결핵균이 존재하는가를 신속하게 판명하여 발병초기에 치료를 시작할 수 있는 장점을 가지고 있어 검사기간이 오래 걸리는 종래의 방법에 비해 매우 유용한 것으로 사료된다.

결 론

임상증상, 방사선 소견 및 검사소견 등을 근거로 골관절 결핵이 의심되어 검사가 의뢰된 30례의 임상검체를 대상으로 생검조직에 대한 결핵균 도말법 및 병소부 농가검물에 대한 결핵균 도말법을 실시하고 파라핀 포매조직에 대해 PCR을 시행하여 한가지라도 양성반응을 보인 경우 결핵성 판절염으로 진단하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 본 실험에서 사용된 1S986, nested-PCR법의 민감도는 0.5 fg으로서 이는 결핵균내 1S986의 통상적인 copy수를 10으로 계산할 때 약 한 개의 결핵균에 해당하였다.

- 결핵균 도말법상 생검조직 가검물 30례 중 7례(23.3%)에서 양성반응을 보였다.

- 골관절 결핵이 의심되어 검사가 의뢰된 30례의 파라핀 포매조직에서 PCR법에 의해 19례(63.3%)의 검체에서 결핵균을 검출할 수 있었는데 생검조직에서 시행한 결핵균 도말법상 양성반응을 보인 7례 중 6례(85.7%), 병소부 농가검물에서 시행한 결핵균 도말법상 양성반응을 보인 7례 중 4례(57.1%), 생검조직을 이용한 결핵균 도말법상 음성반응을 보인 경우가 30례 중 23례(76.7%)였으며 결핵균 도말법상 음성반응을 보인 23례 중 10례(43.5%)에서 PCR 양성반응을 보였다.

- 생검조직 및 병소부 농가검물에서 결핵균 도말법상 모두 음성반응을 보였던 17례 중 10례(58.8%)에서 PCR 양성반응을 보였다.

- 병소부 농가검물에서 시행한 결핵균 도말법에서 민감도는 20%, 특이도는 70%였으며, 생검조직의 결핵균 도말법상 민감도는 27.2%, 특이도는 87.5%, 파라핀 포매조직으로서 PCR법 상 민감도

는 70%, 특이도는 41%로 나타났다.

이상의 결과로서 골관절 결핵의 진단을 위해 파라핀 포매조직에 대한 결핵균 PCR을 실시한 결과 결핵균 도말법에 비해 높은 양성을 보였으며 병리조직소견과 일치하는 소견을 보여 골관절결핵의 확진에 도움을 주었다. 파라핀 포매조직사용시 한정된 조직만을 이용해야만 하고 신선도가 떨어짐으로서 오는 결핵균 파괴 및 농가검물에서 PCR을 시행치 못한 점등의 단점이 있었다. 따라서 골관절 결핵시 결핵의 확진 및 조기진단을 위해서는 신선 생검 조직이나 농가검물에서 결핵균 PCR을 시행하여야 하고, 특히 결핵이 의심되나 결핵균도 말법상 음성반응을 보이는 경우 PCR이 유용하리라 생각된다.

REFERENCES

- 1) 대한정형외과학회 : 골관절의 결핵, 제 4판: 서울, 죄신의학사, 1993, 143-151.
- 2) 박영길, 유재경, 김상재 : Immunoblots상의 발색 밀도 차이를 이용한 결핵의 혈청학적 진단. 결핵 및 호흡기 질환 1990 ; 37 : 183-189.
- 3) 보건사회부 : 결핵현황도(1990), 보건사회통계연보 1992 ; 38 : 12.
- 4) 조상래, 이태윤, 윤경한, 정동현, 정윤섭, 김주민 : 중합효소연쇄반응을 이용한 가검물 내 Mycobacterium tuberculosis의 검출. 대한미생물학회지 1990 ; 25 : 491-499.
- 5) 윤홍식, 오세환, 노권재, 김광덕 : 골관절결핵에 대한 임상적 고찰. 대한정형외과학회지 1984 ; 19 : 317-324.
- 6) 현정애 : 모세관 중합효소연쇄반응에 의한 결핵균 검출. 대구, 계명대학교 의과대학, 1993, 1-40.
- 7) Chiyoji A, Kazue H, Masako W, Yuko K, Mitsuyoshi T, Yudaka F, Chieko M and Susumu G : Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by polymerase chain reaction and gen-probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 3270-3274.
- 8) Cormican MG, Barry T, Gannon F and Flynn J : Use of polymerase chain reaction for early identification of Mycobacterium tuberculosis in positive cultures. J Clin Pathol 1992 ; 45 : 601-604.
- 9) Davidson PT and Horowitz I : Skeletal tuberculosis. A review with patient presentations & discussion. Am J Med 1970 ; 48 : 77-84.
- 10) Ellner PD, Kiehen TE, Cammarata R and Hosmer M : Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. J Clin Microbiol 1988 ; 26 : 1349-1352.
- 11) Folgueira L, Delgado R, Palenque E and Noriega AR : Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples by using a simple lysis method & polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 1019-1021.
- 12) Hermans PWM, Schuitema ARJ, Soolingen DV, Verstynen CPHG, Bik EM, Thole JER, Kolk AHJ and Embden JDA : Specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex stains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1990 ; 28 : 1204-1213.
- 13) Perosio PM and Frank TS : Detection of species identification of mycobacteria in paraffin section of lung biopsy specimens by the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1993 ; 100 : 643-647.
- 14) Popper HH, Winter E and Höler G : DNA of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1994 ; 101 : 738-741.
- 15) Schöningh R, Verstijnen CPHJ, Kuijper S and Kolk HJ : Enzyme immunoassay for identification of heat-killed mycobacteria belonging to the Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium complexes and derived from early culture. J Clin Microbiol 1990 ; 28 : 708-713.
- 16) Shoemaker SA, Fisher JH and Scoggin CH : Techniques of DNA hybridization detect small numbers of mycobacteria with no cross hybridization with nonmycobacterial respiratory organisms. Am Rev Respir 1985, 131 : 760-763.
- 17) Sjöbring U, Mecklenburg M, Andersen AB and Miørner H : Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis. J Clin

- Microbiol 1990 ; 28 : 2200-2204.
- in clinical specimens by DNA amplification. J
Clin Microbiol 1990 ; 28 : 2437-2441.
- 18) Wit DD, Steyn L, Shoemaker S and Sogin M :
Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis*