

중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 이용한 결핵성 경부 림프절염의 진단

경북대학교 의과대학 이비인후과학교실, 계명대학교 의과대학 병리학교실*

박준식 · 최용석* · 손은주* · 박남조* · 이상숙*

= Abstract =

Diagnosis of Tuberculous Cervical Lymphadenitis by Polymerase Chain Reaction

June Sik Park, M.D., Yong Seok Choi,* Eun Ju Sohn,*
Nam Jo Park,* Sang Sook Lee*

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kyungpook National University,
Taegu, Korea

Departments of Pathology,* School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

Tuberculosis is commonly observed as a cause of necrotizing granulomatous inflammation of cervical lymph nodes. However, Ziehl-Neelsen(ZN) stain for acid-fast bacilli(AFB) is often negative. In patients with cervical lymph node enlargement, tuberculous lymphadenitis should be included in the differential diagnosis, and an accurate diagnosis leads to an appropriate treatment. A repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* was amplified by using the nested polymerase chain reaction(PCR) technique from fresh or paraffin-embedded biopsy specimens of 34 patients with cervical lymph node enlargement which was compatible with tuberculous lymphadenitis on hematoxylin-eosin stain.

Ziehl-Neelsen stain was positive for AFB in 21 cases and revealed no organisms in 13 cases. A 188-base-pair fragment, specific for the *Mycobacterium tuberculosis* PCR product was obtained from all 34 cases.

Comparing ZN stain for AFB and PCR results, we confirm that the PCR method is more powerful and more sensitive than ZN stain in the etiological diagnosis of tuberculous lymphadenitis. This report demonstrates the practical use of PCR for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*, particularly in cases difficult to diagnose conventionally with ZN stain. (Korean J Otolaryngol 39 : 11, 1996)

KEY WORDS : Tuberculous cervical lymphadenitis · Polymerase chain reaction(PCR) · *Mycobacterium tuberculosis*.

서 론

한국에서 1990년 현재 X-ray 검사상 증명된 활동성
논문접수일 : 1996년 8월 22일
심사통과일 : 1996년 10월 7일

결핵의 유병률이 1.84%로서 환자수로는 728,000명에
이르는 것으로 추산된다²⁾. 따라서 우리 나라와 같이 결
핵의 유병률이 비교적 높고 부적절한 치료로 인해 재발
율이 매우 높은 나라에서는 보다 신속하고 특이도와 민
감도가 높은 결핵의 진단검사의 필요성이 절실하다고 하

겠다. 최근 결핵에 대한 화학요법의 발달 및 정기적인 흉부 방사선 촬영 및 피부 결핵 반응 검사에도 불구하고 결핵은 아직도 한국에서 비교적 높은 유병률을 보이고 있으며 폐를 제외한 신체부위중 경부의 림프절에 많이 발생하고 있다¹⁾. 결핵성 경부 림프절염은 경부의 종괴로 내원하게 되어 세밀하고 정확한 진단으로 경부에 생기는 다른 종괴들과 감별되어야 한다¹²⁾¹⁴⁾²⁰⁾.

결핵의 치료에 있어서 이들 질환의 정확한 원인의 규명이 필수적으로 적절한 항결핵제 사용이나 수술치료가 요구된다. 결핵을 진단하는데 흔히 사용하는 항산균 도말법은 신속하나 그 특이도가 낮고⁸⁾¹³⁾, 결핵성 림프절염의 진단은 특징적 병리조직 양상, 항산균의 염색에 의한 증명과 *M. tuberculosis*의 배양에 의해 이루어지나 형태적으로는 결핵이 의심되더라도 항산균이 도말이나 조직에서 검출되지 않거나 *M. tuberculosis*가 배양되지 않아 정확한 원인적 진단이 불가능할 경우가 많다. 그리고 *M. tuberculosis* 배양법은 특이도 및 민감도는 높으나 오랜 시일(평균 4~8주)을 요한다⁷⁾⁸⁾¹⁹⁾²⁶⁾.

그 외 방사선 동위원소를 사용하는 BACTEC system¹⁰⁾, 단클론 항체에 의한 효소 면역법²²⁾ 및 DNA 표지자(probe)에 의한 보합결합등이 시도되었으나¹⁰⁾²⁵⁾ 비싼 검사비와 복잡한 검사방법 때문에 좋은 성과를 거두지 못하여⁴⁾ 보다 단순화되어 신속한 결과를 보고할 수 있고 경제적이며 예민도가 높은 *M. tuberculosis* 검출로 빠른 시간내에 결핵을 진단할 수 있는 진단방법이 요구되고 있다.

이에 최근 유전자 기술의 진보로 *M. tuberculosis*의 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 *M. tuberculosis*에 특이한 DNA의 증폭에 의하여 *M. tuberculosis*의 존재를 확인하는 연구가 진행되고 있는데³⁾⁷⁾⁸⁾¹³⁾¹⁹⁾²¹⁾²⁶⁾²⁷⁾, 이에 저자들은 결핵성 림프절염의 확진을 위하여 적출되어 보내진 경부 림프절 조직의 신선한 조직이나 통상적으로 처리되어 제작된 파라핀 포매조직을 대상으로 PCR에 의한 *M. tuberculosis* 검출을 시도하고 이를 조직병리학적 특성과 항산균의 유무와 비교 분석하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

저자들은 임상증상 및 병리조직소견 등을 근거로 결핵성 림프절염이 의심되어 1992년 6월부터 1994년 6월까지 병리조직 검사가 의뢰된 34예의 임상검체의 신선한 생검조직이나 파라핀 포매조직을 대상으로 항산균 염색과 더불어 *M. tuberculosis*의 검출을 위한 nested PCR 을 실시하여 결과를 비교 분석하였다.

연구 대상 34명중 남여비는 1 : 2.1로 평균 31세(4~73세)로 젊은 여자에서 호발하였다. 전 예에서 병리조직 학적으로 건락괴사, 유상피육아종, Langhans 거대세포 소견증 일부 또는 전부를 보였다. 그중 건락괴사를 보인 경우는 28예(82.4%), 유상피육아종을 보인 경우는 31 예(91.2%), Langhans 거대세포를 보인 경우는 27예(79.4%)였다. 전 30예에서 2개이상의 소견을 보였다. 항산균을 조직에서 검출하기 위하여 Ziehl-Neelsen 방법¹⁵⁾을 이용하였다.

2. 방법

*M. tuberculosis*를 검출하기 위해 사용한 PCR 방법은 아래에 기술된 바와 같다.

1) DNA 추출

조직 처리의 일반 과정인 formalin 고정후 paraffin 으로 포매된 생검조직 혹은 수술조직으로부터 박편절단 기를 사용하여 7μm 두께로 3~4조각의 조직편을 분리하여 1.5ml Eppendorf tube(E-tube)에 담았고, 이 때 시료들간의 상호오염을 방지하기 위하여 조직절단에 사용하는 칼날은 1회용으로 사용하였으며, knife holder 는 각 시료마다 xylene으로 깨끗이 닦았다. 그리고 이하의 모든 실험에 사용하는 시약과 기구는 1회용 및 autoclave하여 사용하였다. 1ml xylene으로 탈파라핀하는 과정을 2회 거치고 다시 1ml absolute ethanol로 pellet을 2회 세척한 후 56°C에서 30~40분간 건조시켰다. 신선조직은 각 변 1mm의 부피로 절단하여 2~3조각을 취하였다. 이후 같은 조건으로 100μl의 digestion buffer(50mM tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20)에 부유한 후 200μg/ml 농도로 proteinase K(Kodak)를 가하여 37°C 수조에서 하루밤동안 소

화시켰다. 다음날 spindown 30초후 끓는 물에서 9분간 둔 후, 다시 spindown 30초후 그 상층액을 PCR 반응에 사용하였다.

2) PCR 과정

반응액 총량을 50μl로 하여 reaction buffer(KCl 50 mM, Tris-HCl 10mM pH 9.0 at 25°C, 0.1% Triton X-100), 각각 200μM 씩의 dNTPs(Promega, U.S.A.), MgCl₂ 1.5mM(1차) 2.0mM(2차), primer(한국생공) 각 0.1μM씩, 1unit의 Taq DNA polymerase (Promega)를 중류수로 혼합하여, 94°C 2분간 초기변성 과정을 거친 후 94°C 20초, 65°C 20초, 72°C 45초로 40주기를 시행하고, 마지막 주기 후 72°C에서 5분간 더 연장한 후 4°C에서 보관하는 것으로 program된 Perkin Elmer GeneAmp PCR system 9600에서 PCR을 시행했다. PCR은 온도와 시간의 조건이 동일한 nested PCR을 하였으며, 다만 MgCl₂의 농도를 1차에는 1.5mM이었던 것을 2차에는 2.0mM로, 그리고 template DNA 양을 1차에는 추출물 10μl를 2차에서는 1차 PCR 반응 산물 2μl로 조정, 전체 반응량을 중류수로 맞추었다. 참고로, buffer와 MgCl₂는 polymerase 구입 때 같이 포장되어 들어온 Promega 제품을 사용하였다. 대조군으로서 음성대조군은 중류수, 양성대조군은 동산 병원 임상병리과 미생물학실에서 배양후 *M. tuberculosis*로 진단된 군주를 신선한 조직과 같은 방법으로 DNA를 추출하여 사용하였다. 실험의 전 과정에서 DNA추출과 PCR 및 판독을 위한 전기 영동과정을 모두 각각의 다른 방에서 시행하였다.

사용한 primer의 제작은 한국생공에 의뢰하였으며 그 서열은 다음과 같다.

First round : 245 bp

P1(INS1, 20mer) 5'-CGT-GAG-GGC-ATC-GAG-GTG-GC-3'

P2(INS2, 20mer) 5'-GCG-TAG-GCG-TCG-GTG-ACA-AA-3'

Second round : 188 bp

P3(PT3, 20mer) 5'-GAA-CGG-CTG-ATG-ACC-AAA-CT-3'

P4(PT6, 20mer) 5'-ACG-TAG-GCG-AAC-CCT-GCC-CA-3'

3) 판 독

2차 PCR 반응 산물 10μl를 취하여 gel loading buffer와 혼합하여 1.35% gel(Agarose 0.7% Kodak, Synergel 0.65% Diversified Biotech)에 전압 100V로 20분간 영동하였다. Size marker는 GibcoBRL사의 100 bp짜리를 사용하였고, buffer는 gel 제조와 전기영동에 모두 1X TAE를 사용하였다. Gel제조 과정 중 전자렌지에서 끓인 후 꺼내어 DNA 염색용 ethidium bromide (0.4μg/ml)용액을 첨가 후 plate에 부어 실온에서 약 1시간동안 굳혔다. 그리고, 320nm의 자외선으로 판독 후 Polaloid 사진으로 촬영하여 결과를 남겼다.

성 적

연구 대상 34명중 남여비는 1 : 2.1로 연령은 평균 31세(4~73세)로 젊은 여자에서 호발하였다. 전 예에서 병리조직학적으로 건락괴사, 유상괴육아종, Langhans 거대세포 소견중 일부 또는 전부를 보였다. 그중 건락괴사를 보인 경우는 28예, 유상괴육아종을 보인 경우는 31예, Langhans 거대세포를 보인 경우는 27예였다. 이상 2개이상의 소견을 보인 경우는 30예였다. 항산균의 유무를 알기 위해 시행한 조직표본의 염색에서 19명에서 항산균이 검출되었다. PCR의 민감도는 계단 회석한 *M. tuberculosis* H₃₇ Rv DNA를 표적 DNA로 하여 실시한 결과 0.5fg 이상에서 양성반응을 보였다(Fig. 1). 본 연구에서 신선한 생검조직과 파라핀 포매조직에서 PCR법에 의해 각각 87.0%와 88.2%에서 결핵으로 판명되어 연구대상 모든 예(100%)에서 결핵으로 판명되었다(Fig. 2). 항산균이 검출되지 않았던 15예는 모든 예에서 PCR에 의해 결핵으로 판명되었다.

고 찰

한국에서 1990년 현재 X-ray상 증명된 활동성 결핵의 유병률은 1.84%로 보고되고 있으며²⁾ 세균학적 검사로 증명된 결핵의 유병률은 0.24%이고 직접도말법에 의한 항산성 염색법으로 증명된 유병률은 0.14%에 불과해 결핵의 진단에는 어려움이 많다⁴⁾. 폐외(extrapulmonary) 결핵이 전체 결핵의 10~15%이고³⁾ 최근 여러 가지 항결핵제와 적절한 화학요법의 개발로 그 이환율이

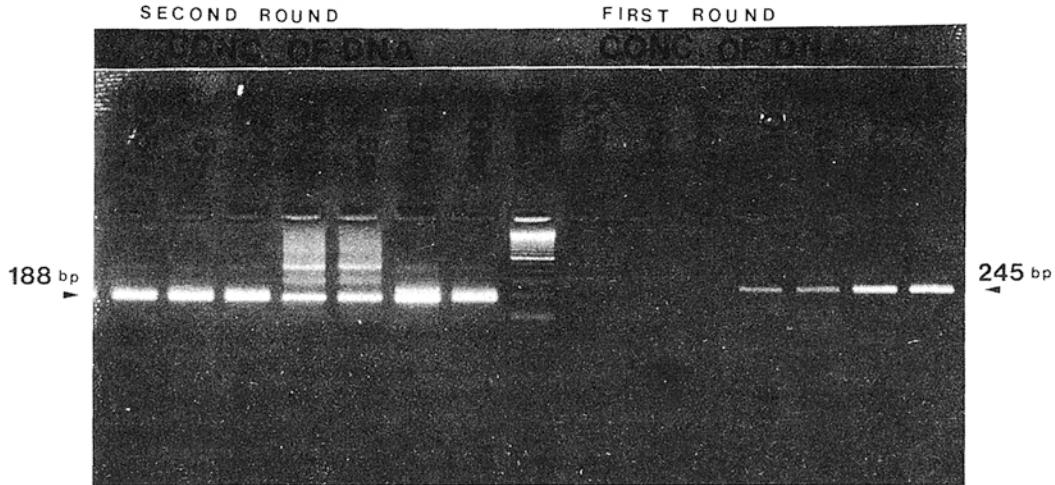


Fig. 1. Sensitivity test. Whole chromosomal DNA derived from a *M. tuberculosis* H₃₇ Rv DNA was used. Size marker 100bp DNA ladder. Numbers at right indicate sizes of DNA fragments in base-pairs(bps) showing that the amplified fragments are of an expected size(188bps) after nested PCR. Distinct bands were amplified until 0.5 fg of DNA in second round of PCR.

감소추세이나 최근 후천성 면역결핍성 환자들과 관련된 결핵의 빈도 증가가 보고되고 있다⁶⁾.

기존의 항산균 도말법은 신속하고 간편한 결핵의 진단 검사법이나 이 방법은 특이도가 낮고 검체 1ml당 *M. tuberculosis*의 수가 1×10^4 개 이상일 때 검출이 가능하므로 예민도는 매우 낮으며⁷⁾⁽²⁶⁾ *M. tuberculosis* 배양법은 검체당 10~100개 이상의 균이 생존해 있어야 양성 배양이 되므로 비교적 예민도가 높은 방법이기는 하나 배양기간이 4~8주가 소요되어⁷⁾⁽⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁶⁾ 임상적인 측면에서 볼 때 결핵치료에 이용되기에에는 많은 어려움이 있다. 병리조직학적 검사방법도 생검조직을 이용한 특징적인 병리조직 소견으로 Langhans 거대세포 주위에 유상피세포 증식 및 임파구의 침윤을 보이는 유상피세포로 구성된 결절형성 및 건락성 괴사를 보이고 동시에 항산균 도말법상 양성반응을 보이면 결핵으로 진단된다. 그러나 항산균 도말법상 음성반응을 보이면서 특징적인 병리조직 소견만 보일 때는 결핵으로 확진하지 못하며, 매독, 방사선균증등의 진균증 및 유육종증에서도 Langhans 거대세포와 유사한 세포가 나타날 수 있고, 류마トイ드 결절에서 보이는 섬유소양 변성이나 매독에서의 고무종 건락성 괴사는 감별을 요하는 등³⁾ 결핵으로 확진하기에는 어려운 점이 있다. 기존의 항산균 도말법, *M. tuberculosis* 배양법 및 병리 조직학적인 검사법등의 단점을 보완할 수 있는 진단법으로 최근 PCR의 개발로 *M. tuberculosis* 검출의 시도는 국내외적으로 활발하게 이루어

지고 있다³⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁻⁹⁾⁽¹³⁾⁽¹⁶⁻¹⁹⁾⁽²¹⁾⁽²³⁻²⁷⁾.

폐결핵에 대해 PCR을 이용한 *M. tuberculosis* 검출 시도는 여러 저자들에 의해 시도되었는데, Perosio와 Frank¹⁹⁾는 임상적으로 폐결핵이 의심된 25예의 파라핀 포매된 폐 생검가검물에서 16예의 PCR양성을 보고하였고, PCR 양성반응을 보인 16예중 15예에서 *M. tuberculosis* 배양검사에서 양성반응을 보였다. 또한 Popper 등²¹⁾은 항산균 도말법에 양성반응을 보인 7예의 파라핀 포매 폐 생검가검물에서 모두 PCR 양성반응을 보고하였다. 또한 조 등³⁾에 의하면 *M. tuberculosis* 배양검사가 의뢰된 105건의 가검물을 대상으로 65예에서 *M. tuberculosis* 배양검사상 양성 반응을 보였고, 65예중 64예 (98.5%)에서 PCR 양성반응을 보였다. Folgueira 등¹¹⁾은 PCR양성반응을 보였던 75예의 가검물중 71예에서 *M. tuberculosis* 배양검사에 의해 양성반응을 보였고, 48예에서 항산균 도말검사상 양성반응을 보였다고 보고하였다.

저자들의 경우 항산균 염색 및 PCR법상의 양성을은 각각 34예중 19예(55.9%) 및 34예중 34예(100%)였다. PCR법상 동일한 환자에서 실시한 생체조직가검물과 파라핀 포매조직에서 7명의 환자에서 각각 상이한 양성반응을 보였는데 이 결과는 가검물체취부위의 상이성에 관련된다고 생각된다. 그러나 전반적인 PCR상의 결과로 보면 생체조직가검물과 파라핀 포매조직에서 87.0%와 88.2%의 유사한 양성을 나타내어 파라핀 포매조직도

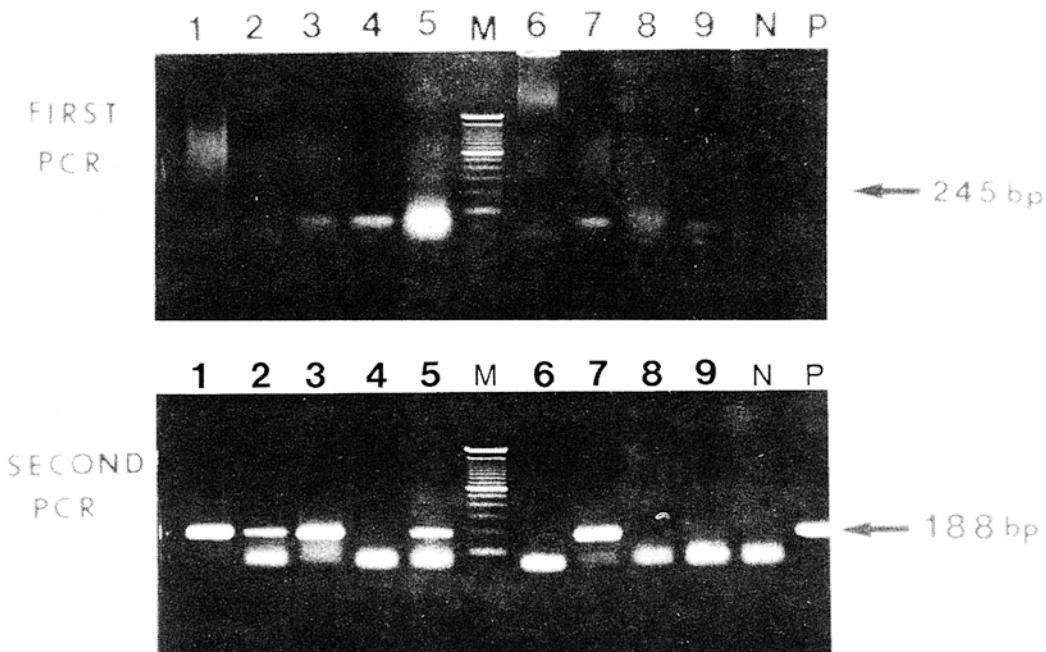


Fig. 2. Detection of amplified product by agarose gel electrophoresis. The DNA extracts were prepared from lymph node tissue from patients with tuberculous lymphadenitis in lanes 1-3, 5, 7. Note the amplified fragments in second PCR corresponding to the 188 bp. There were no specific bands in lanes 4, 6, 8, 9, and N. Lanes 1-3, 5, and 7 patients from tuberculous lymphadenitis : lanes 4, 6, 8, 9 patients from chronic inflammation of skeletal muscle in lane 4, chronic granulomatous inflammation of lymph node in lane 6, cyst of parotid gland in lane 8, and skin biopsy of leprosy in lane 9, respectively. Lane M, 100 bp DNA ladder : lane P : M. tuberculosis DNA-positive control : lane N : Negative control(Q. water)

생체조직가검물에서와 마찬가지로 *M. tuberculosis* 동정에 중요한 자료로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 환자의 파라핀으로 포매된 조직을 이용한 항산균 염색상 음성반응을 보인 15예 중 모든 예(100%)에서 PCR 양성반응을 보여 결핵이 의심되는 환자에서 생검가검물 및 병소의 농가검물에서 항산균 도말법상 음성반응을 보이는 경우 PCR법을 시행함으로써 *M. tuberculosis* 검출에 있어 많은 도움을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 저자들이 사용한 PCR은 proteinase K-chloroform법을 이용해 DNA를 검출한 후 1S986 primer로 PCR을 실시하면 검체에 포함된 *M. tuberculosis* 1개까지 분리할 수 있는 예민도를 가진다.

PCR법의 단점은 살아있는 *M. tuberculosis*와 죽은 것들의 구별이 어려워 환자를 치료하여 균 배양에서 음성이 나온 후에도 PCR에서 양성으로 나오는 경우와 같이 치료기간의 결정 등에 있어서 약간의 문제점이 있으나 가검물에 *M. tuberculosis*가 존재하는가를 신속하게 판명하여 발병초기에 치료를 시작할 수 있는 장점을 가지

고 있어 검사기간이 오래 걸리는 종래의 방법에 비해 매우 유용한 것으로 생각된다.

요약

경부에 생기는 결핵성 림프절염은 한국에서 폐결핵을 제외하고 가장 흔하다. 최근에 증가추세에 있으며 이는 세밀하고 정확한 검사로 다른 경부에 생기는 종괴들과 감별되어야 한다. 또한 이들 질환의 정확한 원인 규명이 치료에 필수적이다. 결핵성 림프절염의 진단은 특징적 병리조직양상, 항산균 염색에 의한 균 증명과 *M. tuberculosis* 배양으로 이루어지나 형태적으로는 결핵이 의심되더라도 항산균이 조직표본이나 도말에서 검출되지 않거나 *M. tuberculosis*가 배양되지 않아 정확한 원인적 진단이 불가능할 경우가 많다. 이에 저자들은 결핵성 림프절염으로 적출되어 보내어진 경부 림프절 조직의 신선한 조직이나 통상적으로 처리되어 제작된 파라핀 블록을 이용하여 *M. tuberculosis*에 대한 PCR을 실시하여 조직

학적 특성 및, AFB의 유무를 PCR 결과와 비교 분석하였다. *M. tuberculosis*에 특수한 반복성 DNA sequence의 primers를 사용하여 188bp fragment를 증폭하는 nested PCR 방법을 이용하였다.

연구대상은 병리조직학적으로 건락파사, 유상피육종, Langhans 거대세포 소견중 일부 또는 전부를 보이는 34명의 환자를 대상으로 하였다. 남여비는 1:2.1로 연령은 평균 31세(4~73세)로 젊은 여자에서 호발하였다. 항산균이 19명에서 조직표본에서 검출되었으며 PCR에 의해 34명에서 결핵으로 판명되었다. 항산균이 검출되었던 모든 예에서 PCR에 의해 역시 결핵으로 판명되었다. 항산균이 검출되지 않았던 15예는 모든 예에서 PCR에 의해 결핵으로 판명되었다. 본 연구에서와 같이 통상적인 병리조직학적 양상만으로 진단이 어려운 결핵성 림프절염의 원인적 진단에 항산균의 염색과 더불어 *M. tuberculosis*에 대한 PCR 방법을 사용한다면 더욱더 진단을 신속하고 정확하게 하여 환자의 치료에 올바른 정보를 제공할 수 있으리라 간주된다.

References

- 1) 김중규 · 이충환 : 경부 결핵성 임파선염. 대한두경부종양학술지 11 : 3-8, 1995
- 2) 보건사회부 : 결핵현황도(1990). 보건사회통계연보 38 : 12, 1992
- 3) 조상래 · 이태윤 · 윤경한 외 3인 : 중합효소연쇄반응을 이용한 가검물내 *Mycobacterium tuberculosis*의 검출. 대한미생물학회지 25 : 491-499, 1990
- 4) 현정애 : 모세관 중합효소연쇄반응에 의한 *M. tuberculosis* 검출. 계명대학교 대학원 박사논문집 : 1-40, 1993
- 5) Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al : Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet II* : 1069-1071, 1989
- 6) Centers for Disease Control and Prevention : Tuberculosis control laws-United States. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 42(RR-15) : 1-28, 1993
- 7) Chiyoji A, Kazue H, Masako W, et al : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and gene-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol* 31 : 3270-3274, 1993
- 8) Cormican MG, Barry T, Gannon F, et al : Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. *J Clin Pathol* 45 : 601-604, 1992
- 9) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al : Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 161 : 977-981, 1990
- 10) Ellner PD, Kiehen TE, Cammarata R, et al : Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* 26 : 1349-1352, 1988
- 11) Folgueira L, Delgado R, Palenque E, et al : Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method & polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31 : 1019-1021, 1993
- 12) Fusegawa H, Miyachi H, Tsutsumi Y, et al : Rapid diagnosis of tuberculous lymphadenitis by amplification of mycobacterial DNA. *Rinsho Byori* 40 : 891-895, 1992
- 13) Hermans PWM, Schuitema ARJ, Soolingen DV, et al : Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex stains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28 : 1204-1213, 1990
- 14) Margileth AM, Chandra R, Altman RP : Chronic lymphadenopathy due to mycobacterial infection. Clinical features, diagnosis, histopathology and management. *Am J Dis Child* 138 : 917-922, 1984
- 15) Manual of Histologic and Special Staining Techniques. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, DC, p176, 1957
- 16) Narita M, Shibata M, Togashi T, et al : Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Paediatr* 81 : 141-144, 1992
- 17) Pao CC, Yen TSB, You JB, et al : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 28 : 1877-1880, 1990
- 18) Patel RJ, Fries JWU, Piessens WF, et al : Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 28 : 513-518, 1990
- 19) Perosio PM, Frank TS : Detection of species identification of mycobacteria in paraffin section of lung

- biopsy specimens by the polymerase chain reaction.* Am J Clin Pathol 100 : 643-647, 1993
- 20) Pinder SE, Colville A : *Mycobacterial cervical lymphadenitis in children : Can histological assessment help differentiate infections caused by non-tuberculous mycobacteria from Mycobacterium tuberculosis?* Histopathology 22 : 59-64, 1993
- 21) Popper HH, Winter E, Hfler G : *DNA of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction.* Am J Clin Pathol 101 : 738-741, 1994
- 22) Schningh R, Verstijnen CPHJ, Kuijper S, et al : *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 28 : 708-713, 1990
- 23) Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, et al : *Identification of mycobacterium tuberculosis by po-*
- lymerase chain reaction.* Lancet 335 : 423-424, 1990
- 24) Shawar RM, el-Zaatari FAK, Nataraj A, et al : *Detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and non-isotopic hybridization methods.* J Clin Microbiol 31 : 61-65, 1993
- 25) Shoemaker SA, Fisher JH, Scoggin CH : *Techniques of DNA hybridization detect small numbers of mycobacteria with no cross hybridization with non-mycobacterial respiratory organisms.* Am Rev Respir 131 : 760-763, 1985
- 26) Sjoberg U, Mecklenburg M, Andersen AB, et al : *Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol 28 : 2200-2204, 1990
- 27) Wit DD, Steyn L, Shoemaker S, et al : *Direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by DNA amplification.* J Clin Microbiol 28 : 2437-2441, 1990