

결핵 진단에 있어서 In-house 중합효소연쇄반응법과 전통적인 진단 방법간의 비교검토

양희영 · 이희주 · 박수연 · 이광길 · 서진태

경희대학교 의과대학 진단검사의학교실

Comparison of In-house Polymerase Chain Reaction Assay with Conventional Techniques for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis*

Hee Young Yang, M.D., Hee Joo Lee, M.D., Su Yon Park, M.D., Kwang Kil Lee, M.D., and Jin Tae Suh, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Collage of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Background : The polymerase chain reaction (PCR) assay, introduced as a fast and sensitive diagnostic method, has been known to be useful in detecting *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore the purpose of this study was to evaluate the usefulness of an in-house PCR assay in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by comparing PCR results with those of conventional diagnostic techniques.

Methods : We assessed the diagnostic yield of the in-house PCR assay retrospectively based on the patient's medical records using data from previously evaluated specimens submitted for PCR amplification IS6110 sequences by GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, CT, USA). All samples had been examined for detection of *M. tuberculosis* by acid-fast stain and culture assay and the results from the 3 methods were analyzed.

Results : The majority of cases (1,727 cases, 96.6%) showed concordant results between in-house PCR, AFB stain, and culture methods; only 60 cases (3.4%) displayed discordant results. The sensitivities, specificities and positive and negative predictive values of each method were as follows: 81.0%, 99.6%, 95.0% and 98.4%, respectively for the in-house PCR; 63.4%, 100%, 100% and 96.9%, respectively for AFB staining method; and 83.8%, 100%, 100% and 98.6%, respectively for culture assays.

Conclusions : The PCR assay shows a high sensitivity and specificity and is a reliable test for an early diagnosis of tuberculosis. (*Korean J Lab Med* 2006;26:174-8)

Key Words : *Mycobacterium tuberculosis*, In-house polymerase chain reaction (PCR) assay, Acid-fast stain

서 론

접 수 : 2006년 2월 16일 접수번호 : KJLM1927
수정본접수 : 2006년 4월 4일
게재승인일 : 2006년 4월 6일
교 신 저 자 : 이 희 주
우 130-702 서울시 동대문구 회기동 1
경희의료원 진단검사의학과
전화 : 02-958-8674, Fax : 02-958-8609
E-mail : leehejo@khmc.or.kr

*이 논문은 2002년도 고령의학술연구비에 의하여 작성되었음.

결핵의 진단은 임상소견, X선 소견 및 결핵균의 검출 등으로 할 수 있다. 이러한 결핵균을 검출하기 위한 방법으로 항산염색, 결핵균 배양 및 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)이 이용되고 있다. 항산염색은 방법이 간단하고 비용이 저렴하며, 신속하게 결과를 얻을 수 있으나, 검체 1 mL 당 5,000-10,000개의 균이 존재하여야 검출이 가능하며 결핵균과 비결핵항

산균을 구별하지 못하는 단점이 있다. 민감도는 22%내지는 78%로 비교적 낮고, 특이도는 99%에서 100%로 보고되고 있다[1-4].

배양법은 검체 1 mL 당 100개 이상 존재시 검출이 가능하고 민감도는 80%에서 85%로 항산성 염색법보다 높게 보고되고 있고, 특이도가 100%에 가까워 확진 방법으로 쓰이고 있다. 또한 배양된 균으로 항결핵제에 대한 감수성 검사가 가능하지만, 배양 기간이 3주에서 6주 이상 소요되는 문제점이 있다. 균 배양시간을 단축하기 위해 자동배양기기에 의한 방법이 일부 사용되고 있으나 이 역시 2주 이상의 배양기간이 소요되며 비용이 많이 들고, 검사 과정이 복잡하다는 단점이 있다[1-4].

중합효소연쇄반응법은 검체로부터 직접 결핵균을 검출할 수 있고 검체 내에 소수의 균이 존재하더라도 검출이 가능하다. 그리고 민감도와 특이도가 높으며 신속한 결과를 얻을 수 있어 결핵의 조기진단 목적으로 이용되고 있는 검사방법으로 알려져 있다. 하지만 높은 민감도로 인하여 이미 죽은 결핵균이 존재하거나 과거 감염의 경력이 있는 경우도 양성인 나올 수 있기 때문에 결핵을 확진하는데 있어 어려움이 있다[1, 5-7].

경희의료원에서는 결핵균을 검출하기 위해 IS6110-based in house, 이중(nested) 중합효소연쇄반응법을 시행하고 있다. 이는 많이 이용되고 있는 상품화된 Roche Amplicor *M. tuberculosis* test에 비해 다복제 유전자(multiple copy gene)를 이용하고 많은 검체량을 요구하므로 높은 민감도를 보인다는 특징이 있으나 여러 단계의 수작업 과정으로 인해 검체 오염이 높을 수 있다고 보고되고 있다[3, 8].

이에 본 연구에서는 경희의료원에서 시행된 in-house 중합효소연쇄반응과 항산염색 및 배양법을 비교하여, 결핵을 진단하는데 있어서 in-house 중합효소연쇄반응법 결과의 유용성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

2003년 7월 1일부터 2005년 6월 30일까지 경희의료원에 내원하여 결핵균에 대해 in-house 중합효소연쇄반응을 시행하였던 1,787 검체를 대상으로 항산염색과 배양의 결과를 환자 의무기록을 검토하여 후향적으로 조사하였다.

Table 1. Sequences of primers used for the detection of *M. tuberculosis* by in-house PCR

Name	Function	Position of IS6110	Sequences (5'→3')
TB1	Primer of first PCR	555-572	CTCAAGGAGCACATCAGC
TB2	Primer of first PCR	1111-1084	TCATAGGAGCTTCCGACC
TB3	Primer of second PCR	590-609	CTACGGTGTTTACGGTGCCC
TB4	Primer of second PCR	874-855	TAGGCGTCGGTGACAAAGGC

Abbreviation: PCR, polymerase chain reaction.

2. 연구방법

1) 대상 검체와 검체 전처리

검체의 종류는 객담, 농, 소변, 기도세척액, 뇌척수액, 기타 체액 등이었다.

객담, 농, 기도세척액은 검체와 동량의 4% NaOH를 멸균된 50 mL 관에 넣고 30초간 흔들어 혼합 후 20분 동안 실온(20-25°C)에 두었다가 혼합액에 멸균 증류수를 50 mL 눈금까지 넣어 희석시켰다. 이것을 흔든 후 3,000 g 이상으로 15-20분간 냉장원심분리 후 상층액을 버리고 침전액으로 검사하였다.

소변, 뇌척수액과 기타 체액은 NaOH 처리없이 원심분리하여 사용하였다.

2) 항산염색 및 결과 판독

침전물을 원심하여 도말하는 집균법을 이용하여 표본은 80°C 슬라이드 건조대에 고정 후 칠넬센염색법으로 염색하였다. 200배 시야에서 전 영역을 검색하여 1,000배 유침 렌즈 시야에서 검경 후 300시야 이상 관찰하여 판정은 CDC (Center for Disease Control) 법에 따라 -에서 4+까지 구분하여 보고하였다[9].

3) 결핵균 배양 방법과 결과 판독

검체를 오염제거 후 원심분리한 침전액을 3% Ogawa 배지에 접종 후 37°C 암소에서 배양하였다. 1주에 한번씩 관찰하면서 최소한 8주 동안 배양하였다.

집락이 생기면 항산염색을 하여 확인하였다.

4) In-house 중합효소연쇄반응

NaOH로 처리된 검체를 50 mL가 되도록 멸균증류수를 첨가 혼합 후 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 침전물을 Tris EDTA (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) 완충액으로 풀어 7,000 rpm으로 5분간 원심 분리하는 과정을 2회 더 반복 후 상층액을 완전히 제거한 후 침전물을 50-200 μ L의 5% Chelex 100과 Tris EDTA 완충액에 용해시켰다. 이를 10분간 끓여준 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액 1-2 μ L를 취하여 중합효소연쇄반응에 사용하였다. 반응 혼합물은 14 μ L의 증류수, 2 μ L 중합효소연쇄반응 완충액, 3.0 mM MgCl₂, 0.8 μ L 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate (Core Biosystem, Seoul, Korea), 0.1 μ L loading dye, 1.0 μ L 중합효소연쇄반응 시발제(TB1+TB2, Table 1) 10 pM/ μ L와 0.1 μ L Taq DNA polymerase (Core Biosystem) 5 U/ μ L 증폭대상의 DNA를 2 μ L 가하여 20 μ L가 되도록 하여 잘 섞어 준 후 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응 시발제(Bioneer, Daejeon, Korea)는 oligonucleotide purification column (OPC) 정제를 한 제품을 이용하였다. 중합효소연쇄반응 조건은 94°C에서 5분 전열변성(predenaturation)한 후 94°C에서 20초간 열 변성(denaturation), 60°C에서 20초간 결합(annealing), 72°C에서 30초

간 연장(extension) 단계를 30주기 시행 후, 72°C 5분간 1회 연장(extension) 단계를 시행하였다.

18 μ L의 반응 혼합물(1.0 μ L PCR 시발제 TB3+TB4, Table 1)에 일차 중합효소연쇄반응 산물을 증류수로 10배 희석하여 2 μ L 가한 후 일차 중합효소연쇄반응과 같은 조건으로 반응을 수행하였다. GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, CT, USA)을 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

이차 중합효소연쇄반응 후 준비된 2% 아가로오스겔에 90 V에서 40분간 이동시킨 후 겔판을 transilluminator 위에 올려 놓고 DNA 분획을 확인하여 285 bp 크기의 분획이 보이면 양성으로 판정하였다. DNA 크기 표지자는 100 bp DNA ladder (Bioneer)를 이용하였고, 임상검체에서 분리된 *Mycobacterium tuberculosis* 균주에서 DNA를 추출하여 양성대조로 하였다.

중합효소연쇄반응의 교차오염을 줄이기 위해 검체에서 DNA를 추출하는 과정과 증폭하는 과정을 각각 분리하여 실시하였다.

3. 결핵의 진단

결핵균 배양 결과가 양성인 경우 결핵으로 판정하였고, 배양 결과가 음성인 경우 항산염색이나 중합효소연쇄반응에서 양성인 나온 경우 임상증세, 방사선 소견, 혈액학 소견, 조직 소견 등의 검사 소견과 항결핵제 치료에 대한 반응 등을 고려하여 판정하였다 [3, 4, 10].

Table 2. Results of AFB stain, culture and in-house PCR, according to sample origin

Type of sample	Total N of samples (%)	N of positive samples		
		In-house PCR	AFB stain	Cul- ture
Pulmonary specimens	519 (29.0)			
Sputum	420 (23.5)	49	44	56
Bronchial aspirate	99 (5.5)	13	10	11
Extrapulmonary specimens	1,268 (71.0)			
Pleural fluid	552 (30.9)	20	13	22
Cerebrospinal fluid	220 (12.3)	1	0	0
Urine	156 (8.7)	10	6	10
Tissue	136 (7.6)	7	6	7
Pus	95 (5.3)	21	11	13
Ascites fluid	31 (1.7)	0	0	0
Blood	29 (1.6)	0	0	0
Gastric aspirate	8 (0.5)	0	0	0
Bone marrow	5 (0.3)	0	0	0
Pericardial fluid	4 (0.2)	0	0	0
Synovial fluid	2 (0.1)	0	0	0
Other	30 (1.7)	0	0	0
Total	1,787 (100.0)	121	90	119

Abbreviations: AFB, acid fast bacilli; PCR, polymerase chain reaction.

결 과

1. 임상 검체에 대한 각 검사법의 결과

전체 1,787검체 중 호흡기 검체는 519건(29.5%)으로 객담 420건(23.5%), 기도 흡인액 99건(5.5%)이었고, 호흡기의 검체는 1,268건(71.0%)으로 흉수 552건(30.9%), 뇌척수액 220건(12.3%), 소변 156건(8.7%), 조직 136건(5.3%), 농 95건(5.3%), 위 세척액 8건(0.5%) 등이었다(Table 2).

호흡기 검체는 62건(11.8%)에서 in-house 중합효소연쇄반응에 양성, 54건(10.2%)이 항산염색에 양성, 67건(12.7%)이 결핵 배양 검사에 양성소견을 보였다. 호흡기의 검체는 59건(4.7%)에서 in-house 중합효소연쇄반응에 양성, 36건(2.9%)이 항산염색에 양성, 52건(4.1%)이 결핵 배양 검사에 양성소견을 보였다. 가장 의뢰가 많았던 검체는 흉수로 20건(3.6%)에서 in-house 중합효소연쇄반응에 양성, 13건(2.4%)이 항산염색에 양성, 22건(4.0%)이 결핵 배양 검사에 양성소견을 보였고, 그 다음 의뢰가 많았던 검체는 객담검체로 49건(11.7%)에서 in-house 중합효소연쇄반응에 양성, 44건(10.5%)이 항산염색에 양성, 56건(13.3%)이 결핵 배양 검사에 양성소견을 보였다.

총 1,787검체 중 142검체(8.0%)가 결핵으로 판정되었다. 142검체 중 115건(7.5%)이 in-house 중합효소연쇄반응에 양성, 90건(5.0%)이 항산염색에 양성 그리고 119건(6.6%)이 결핵 배양 검사에 양성소견을 보였(Table 3).

In-house 중합효소연쇄반응을 시행했던 검체에서 비결핵마이코박테리아(nontuberculous mycobacterium, NTM)는 1건으로 농 검체에서 *Mycobacterium fortuitum* complex로 동정되었고 in-house 중합효소연쇄반응과 항산염색에 음성소견을 보였다.

In-house 중합효소연쇄반응을 종합적인 임상결과와 비교했을 때 민감도 81.0%, 특이도 99.6%, 양성 예측도 95.0%, 음성 예측도 98.4%를 보였고 항산염색 결과의 민감도는 63.4%, 특이도 100.0%, 양성 예측도 100.0%, 음성 예측도 96.9%를 보였으며 배양 결과의 민감도는 83.8%, 특이도 100.0%, 양성 예측도 100.0%, 음성 예측도 98.6%로 나타났다(Table 4).

Table 3. Comparison of results of in-house PCR with those of AFB stain and culture

Diagnosis N (%)	In-house PCR	AFB stain	Culture	N (%)
Tuberculosis	+	+	+	88 (4.9)
142 (8.0)	+	-	+	4 (0.3)
	+	-	-	23 (1.3)
	-	-	+	25 (1.4)
	-	+	+	2 (0.1)
Non tuberculosis	+	-	-	6 (0.3)
1,645 (92.0)	-	-	-	1,639 (91.7)

Abbreviations: See Table 2.

Table 4. Sensitivities, specificities, positive predictabilities, negative predictabilities, true positive, true negative, false positive and false negative of in-house PCR, AFB stain and culture

	Sen- sitivity (%)	Speci- ficity (%)	Predictive value (%)		True posi- tive (%)	True neg- ative (%)	False posi- tive (%)	False neg- ative (%)
			posi- tive	neg- ative				
In-house PCR	81.0	99.6	95.0	98.4	80.9	99.6	0.4	19.1
AFB stain	63.4	100.0	100.0	96.9	63.1	100.0	0.0	36.9
Culture	83.8	100.0	100.0	98.6	83.7	100.0	0.0	16.3

Abbreviations: See Table 2.

2. 불일치를 보이는 검사결과의 분석

전체 1,787검체 중 60검체에서 항산염색, 배양, in-house 중합효소연쇄반응에서 불일치 소견을 보였다. 이 중 54건은 결핵이었고 6건은 다른 질환이었다. 결핵으로 진단된 54건 중 in-house 중합효소연쇄반응이 음성을 보였으나 배양에서 양성을 보인 27건은 in-house 중합효소연쇄반응이 위양성을 보인 경우였다. 불일치 항목 중 결핵이 아니었던 6검체의 최종 진단은 각각 폐렴 2예, 식도암 1예, 기관지염 1예, 만성폐쇄성 폐질환 2예이었다. 6건 모두 in-house 중합효소연쇄반응만 양성이고 항산염색과 배양법은 음성인 경우로 in-house 중합효소연쇄반응이 위양성을 보인 경우로 판단되었다(Table 5). 이들 각각의 검체를 살펴보면 폐렴은 2건 다 흉수검체였고, 식도암은 객담, 기관지염은 기도 흡인액, 그리고 만성폐쇄성폐질환은 1건은 기도 흡인액, 다른 1건은 객담이었다.

고 찰

중합효소연쇄반응을 이용한 검사는 가검물에 미량의 결핵 DNA가 존재하더라도 짧은 시간에 대량으로 증폭시키므로 민감도와 특이도가 높으며 검사전 과정이 수 시간 이내에 가능하기 때문에 검사를 의뢰한 날에 검사 통보가 가능하지만, 반드시 숙달되고 정도 관리가 제대로 이루어지는 검사실에서만 시행하여야 한다.

결핵 중합효소연쇄반응은 연구마다 민감도는 63-100%, 특이도는 62.6-100% 등으로 다양한 성적이 보고되고 있다[1, 5-7]. 본 연구에서는 민감도는 81.0%, 특이도는 99.6%로 민감도와 특이도 모두 좋은 성적을 보였다.

Bogard 등[10]은 6개 실험실에서 결핵의 각 진단법을 비교 실험한 결과 항산염색, 배양, 중합효소연쇄반응의 민감도는 각각 55.5%, 89.3%, 85.2%이며 특이도는 모두 99.7%로 본 연구보다 민감도, 특이도 모두 다소 높은 결과치를 보고하였다. 또한 항산염색 양성인 경우 중합효소연쇄반응의 민감도는 96.1%, 음성인 경우 71.7%를 보였음을 보고하였다[10]. Almeda 등[3]에 따르면 항산염색, 배양, 중합효소연쇄반응의 민감도는 각각 41.3%, 65.7%, 59.0%로 본 연구보다 훨씬 낮은 민감도를 보이며 특이도는 모두

Table 5. Outcome of discordant cases

Group	In-house PCR	AFB stain	Culture	N (%)	Final Diagnosis (N of cases)
1	+	-	-	29 (48.3)	Tuberculosis (23) Pneumonia (2) Esophageal cancer (1) Bronchitis (1) COPD (2)
2	+	-	+	4 (6.7)	Tuberculosis (4)
3	-	-	+	25 (41.7)	Tuberculosis (25)
4	-	+	+	2 (3.3)	Tuberculosis (2)

Abbreviations: See Table 2.

97%가 넘었다고 보고하였다. 중합효소연쇄반응과 항산염색을 같이 시행시 민감도가 65%로 배양과 비슷한 수준의 결과를 보여 결핵의 표준 진단법으로 이용할 수 있음을 제시하였다.

Eing 등[8]은 상품화된 Roche Amplicor와 in-house 중합효소연쇄반응을 비교하였는데 민감도는 각각 66.33%, 91.08%였으며, 특이도는 각각 99.71%, 99.85%를 나타냈다. 저자들은 Amplicor가 더 낮은 민감도를 보이는 이유로 Amplicor는 단백질 유전자를 이용하는데 비해 in-house 중합효소연쇄반응은 다복제 유전자를 이용하고, Amplicor는 검체량을 0.1 mL 사용하였지만 in-house 중합효소연쇄반응은 이에 비해 더 많은 양의 검체량(1.0 mL)을 이용한다는 점, Amplicor는 in-house방법의 검출 방식인 Southern blotting 보다 민감도가 낮은 ELISA 방식을 사용하고 있다는 점 등을 들고 있다. Schirm 등[11]은 배양, 항산염색, Roche Amplicor 그리고 in-house 중합효소연쇄반응의 민감도를 각각 88.9%, 52.4%, 70.4%, 92.6%, 특이도는 모두 98% 이상으로 보고하고 있으며 Amplicor가 더 낮은 민감도를 보이는 이유로 방해 요소에 더 영향을 받기 때문으로 보고 하였다.

본 연구에서 in-house 중합효소연쇄반응에서 위양성을 보였던 예의 임상 진단은 폐렴, 식도암, 기관지염 및 만성 폐쇄성 폐질환이었다. 위양성으로 나온 원인으로 검체 처리 과정 중 결핵균 핵산산물에 의한 실험실 오염을 들 수 있다[5, 12-14]. 검체를 처리하는 작업이 다단계로 이루어지는 in-house 중합효소연쇄반응의 경우 상품화된 방식의 중합효소연쇄반응을 이용한 경우보다 오염 가능성이 더 높아질 수 있다고 보고되고 있다[12]. 또 다른 원인으로 생균과 사균의 핵산을 구별하지 못하는 특징으로 인해 사균으로 오염되어도 결핵 양성 소견으로 나올 수 있다는 점을 들 수 있다[5, 12-14].

In-house 중합효소연쇄반응에서 위양성이 나온 원인으로 우선 증폭억제제자가 존재 하는 경우와 항산염색이나 배양검사에 비교하여 적은 검체량 사용으로 인하여 DNA추출 과정 중 결핵균이 소실되는 경우 그리고 중간 조작 과정 중 반응 혼합액이 적량 투입되지 못한 경우 등을 의심해 볼 수 있다[5, 14].

중합효소연쇄반응은 현재 약제 감수성 검사와 비결핵마이코박테리아 균 동정을 위해서는 배양이 요구되므로 항산균 도말 양성인 검체에서 결핵을 확진하는데만 이용하도록 권하고 있다[4].

이러한 분자생물학적 기법은 기존 전통적 검사법의 한계를 보완할 수 있는 방법으로 기대되고 있다. 하지만 시행하는데 있어서 많은 비용이 들고, 기법이 복잡하여 숙련된 기술자가 요구되며, 임상적 유용성이 제대로 평가되지 못하여 아직은 제한되어 이용되고 있다.

결론적으로 본 연구의 결과를 살펴보았을 때 in-house 중합효소연쇄반응은 결핵 진단에 있어서 높은 민감도와 특이도를 보여 결핵을 조기 진단하는데 있어서 신뢰할 수 있는 방법임으로 사료되었다.

요 약

배경 : 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 측정은 신속하고 민감하여 결핵의 조기진단 목적으로 이용되고 있는 검사로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 in-house PCR과 전통적 진단법의 결과를 비교하여 결핵을 진단하는데 있어서 in-house PCR의 유용성을 알아보고자 하였다.

방법 : GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, CT, USA)에 의해 IS6110를 표적위치로 하여 증폭한 in-house PCR을 시행한 1,787검체의 결과를 환자의 임상 기록을 기반으로 후향적으로 조사하였다. 모든 검체는 항산염색과 배양법에 의해 결핵균 검출검사를 하였고, 이 세 방법을 비교분석하였다.

결과 : In-house PCR, 항산염색 그리고 배양 결과가 일치할 보이는 건수는 1,727건(96.6%)이고 불일치를 보이는 건수는 60건(3.4%)이었다. 각 방법의 민감도, 특이도, 양성 예측도, 음성 예측도는 다음과 같다: In-house PCR은 81.0%, 99.6%, 95.0%, 98.4%를 보였고 항산 염색은 63.4%, 100.0%, 100.0%, 96.9%를 보였으며 배양 결과는 83.8%, 100.0%, 100.0%, 98.6%로 나타났다.

결론 : In-house PCR 결과는 결핵 진단에 있어서 높은 민감도와 특이도를 보이는 신뢰할 만한 조기진단 방법으로 사료되었다.

참고문헌

1. Yeam YS, Jeong OY, Jang SJ, Moon DS, Park YJ. Comparison of culture, Acid-Fast stain and polymerase chain reaction assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Korean J Clin Pathol 1995;15:594-603. (염양숙, 정옥연, 장숙진, 문대수, 박영진. 결핵균 검출을 위한 배양법, 항산성 염색법과 중합효소연쇄반응법간의 비교. 대한임상병리학회지 1995;15:594-603.)
2. Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of Tuberculosis in a population with High prevalences of Tuberculosis and Human Immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 2004;42:1012-5.
3. Almeda J, Garcia A, Gonzalez J, Quinto L, Ventura PJ, Vidal R, et al. Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:859-67.
4. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1376-95.
5. Kim JH, Jang SJ, Moon DS, Park YJ. Evaluation of two PCR-hybridization methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Korean J Lab Med 2003;23:32-8. (김진희, 장숙진, 문대수, 박영진. 결핵균 검출을 위한 두 가지 PCR-Hybridization 검사법의 평가. 대한진단검사의학회지 2003;23:32-8.)
6. Lee KE, Cho JH, Moon YH. Comparison of stain methods with PCR and culture for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the sputum. Korean J Clin Pathol 1998;18:201-7. (이기은, 조지현, 문영희. 객담에서 결핵균 검출을 위한 염색법과 중합효소연쇄반응법 및 배양법간의 비교. 대한임상병리학회지 1998;18:201-7.)
7. Shin WS. Diagnosis of tuberculosis; Serodiagnosis and Molecular biologic Approach. Tbc and Resp Dis 1992;39:1-6. (신완식. 결핵진단의 면역학적 및 분자생물학적 방법. 결핵 및 호흡기 질환 1992;39:1-6.)
8. 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.
9. Betty AF, Daniel FS, et al. eds. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed. St. Louis: Mosby, 2002: 552.
10. Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, Alonso R, Fenner T, Schirm J, et al. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens in Routine Clinical Practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:724-31.
11. Schirm J, Oostendorp LA, Mulder JG. Comparison of Amplicor, In-house PCR, and Conventional Culture for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. J Clin Microbiol 1995;33:3221-4.
12. Cohen RA, Muzaffar S, Schwartz D, Bashir S, Luke S, Mcgartland LP, et al. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis Using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:156-61.
13. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, et al. Clinical Evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. J Clin Microbiol 1995;33:90-5.
14. Beavis KG, Lichty MB, Jungkind DL, Giger O. Evaluation of Amplicor PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. J Clin Microbiol 1995;33:2582-6.