Tuberculosis and Respiratory Disease 결핵 및 호흡기질환, Vol. 39, No. 1, February, 1992

□ 종 설 □

결핵진단의 면역학적 및 분자생물학적 방법

가톨릭대학 의학부 내과학교실

신 완 식

= **Abstract** =

Diagnosis of Tuberculosis; Serodiagnosis and Molecular Biologic Approach

Wan Shik Shin, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

The diagnosis of tuberculosis is usually established using staining and culturing techniques. Fluorescent stains have improved the sensitivity of direct microscopy. Improved culture media coupled with radiometric means of detecting early mycobacterial growth have shortened the time needed for cultural diagnosis. Rapid immunodiagnostic techniques based on the detection of mycobacterial antigen or of antibodies to theses antigens have not, however, come into widespread clinical use.

The DNA or RNA hybridization tests with labeled specific probes which have been described so far are not sensitive enough to be used for clinical speicimens without prior culturing.

The advent of the polymerase chain reaction (PCR) has opened new possibilities for diagnosis of microbial infections. This technique has already been applied to a number of microorganisms. In the field of mycobacteria the PCR has been used to identify and to detect DNAs extracted from various mycobacteria. However, despite the extraordinary enthusiasm surrounding this technique and the considerable investiment, PCR has not emerged from the developmental "trenches" in the passed several years. It may be a considerable lenth of time before clinical microbiology laboratories become PCR playgrounds because many details remain to be worked out.

Key Words: Diagnosis tuberculosis

서 론

결핵은 1990년 현재 우리나라 5세 이상 인구에서 엑스선상 활동성 폐결핵의 추정환자수가 72만명에 이르고 도말 배양 균 양성 환자수도 9만 5천으로 추정되고 있어 감소추세이기는 하나 동남아의 몇나라를 제외하고는 아직도 유병률이 높은 실정이다[1].

결핵의 진단법은 항산균(acid fast bacilli; AFB)이 검출되면 큰 도움을 주지만 nocardia나 일부의 corynebacterium에서도 양성반응을 보이는 수가 있어 추정진단에 불과하고 예민도가 낮아 10^4/ml 이상의 균이 존재하여야 한다.

배양검사법은 양성으로 나타나면 특이도는 100%에 이르나 동정을 해야하는 번거로움이 있고 3~6주 이상의 배양시간이 소요될 뿐 아니라 균수가 적을 때는 여러번 반복하지 않으면 안된다[2]. 배양시간을 단축시키기 위해 BACTEC 배지가 개발되어 $^{14}CO_2$를 붙인 palmitic acid를 측정하는 검사도 10~12일간이 소요되고 비용이 많이 들며 검사과정이 복잡해 널리 사용되기 어렵다[3].

본 종설에서는 결핵의 진단에 많은 연구가 있었던 면역학적 방법 및 최근 많이 시행되고 있는 중합효소연쇄

반응을 이용한 결핵균의 증명등에 대하여 약술하고자 한다.

1. 면역학적 진단

결핵진단을 위해 세포면역 및 체액면역반응, 특수항원등에 대한 수많은 연구에도 불구하고 간단하고 정확, 신속한 면역학적 방법은 아직까지 개발되지 못하고 있다. 물론 이러한 노력들이 이론적으로는 모두 훌륭하지만 예민도와 특이도가 낮고 활동성병변과 과거 감염의 구별도 힘들 뿐 아니라 일부 방법은 기술적으로 까다롭고 비용이 많이 드는등 실제적으로 많은 문제점들이 있기 때문이다.

1) Tuberculin 피부반응검사

tuberculin은 OT(old tuberculin)와 PPD(purified protein derivative)의 두 종류가 있으나 현재는 PPD를 피내주사하는 Mantoux 검사가 가장 많이 사용된다. 피부반응 검사는 결핵균에 대한 세포면역의 활성화 여부를 보는 검사로 특이성은 있지만 언제인가 결핵균에 의한 감염이 있었다는 것 뿐이고 반드시 결핵균에 의한 발병상태를 의미하는 것은 아니다[4].

우리나라에서는 15세 이상의 약 60%가 피부반응 양성이므로 이를 진단목적으로 사용 하기는 어렵다[1].

그외에 세포면역에 대한 다른 검사방법들도 많이 개발되었으나 기술적으로 어렵고 tuberculin 피부반응검사보다 더 나은 결과는 얻지 못하고 있다[5].

2) 항 결핵항체 검출방법

결핵환자 혈청내의 IgG 항체는 특이적이고 농도도 높아 결핵의 면역학적 진단에 주로 많이 사용되고 있으며 IgM은 비특이적이고 IgA는 특이적이지만 역가가 낮아 이용하기 어렵다[6,7].

면역학적 진단방법으로는 Nassau등[8]이 효소결합 면역분석법을 이용한 후 가장 많이 사용되고 있다.

결핵균의 항원에는 비정형항산균과 교차반응을 나타내는 항원이 많으므로 결핵균에만 특이한 정제된 항원을 얻는 것이 무엇보다 중요하다. 결핵균 배양액에서 얻은 정제되지 않은 항원에 대한 항체를 이용한 결핵 진단의 예민도는 50~94%, 특이도는 85~98%로 알려져 있고[8] PPD를 이용한 연구에서는 예민도와 특이도가 각각 60~70%, 84~93% 정도이며[9,10] 정제단백항원인 항원 5를 이용한 연구결과는 예민도가 64~87%, 특이도는 92~100%로 비정제 항원에 비해 높은 특이도를 보였다[11,12]. 또한 TB72로 이름지어진 단세포군 항체에 특이적인 항원에 대한 IgG 항체를 억제방사면역측정법(inhibition radioimmunoassay)으로 측정한 것은 예민도 53%, 특이도 98%를 나타내었다[13].

대부분의 결핵균에 대한 항체반응은 약하게 나타날 뿐 아니라 결핵균의 종특이항원이 없이 모든 결핵균에 존재하는 항원에 대해 항체반응이 나타나고 사람마다 항체생산에 차이가 많아 실제 임상에서 사용하기가 어렵다. 앞으로 현재까지 사용된 세포질항원이외에 살아있는 결핵균에서 생산되어 나오는 항원에 대한 항체를 측정하는 것이 기대된다.

3) 균체성분 검출방법

최근 임상검체에서 결핵균 항원을 검출하기 위해 면역측정법을 이용하는 방법들에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며 또한 좋은 결과를 얻고 있다.

Strauss와 Wu등[14,15]은 가토항혈청을 이용하여 방사면역측정법으로 측정하였고 Kadival 등[16]은 BCG에 대한 토끼항체를 이용하여 방사면역측정법을 사용하였으며 Yanez등[17]은 BCG에 대한 토끼항체를 이용하여 효소결합면역분석법으로 측정하였고 Raja등[18]은 항원 5에 대한 염소항체를 이용하여 억제효소결합면역분석법을 사용하여 높은 특이도를 발표하였다.

또한 결핵성 뇌막염환자의 뇌척수액에서도 이와 같은 방법들을 이용하여 66~100%의 예민도와 95~100%의 특이도를 보고하고 있다[19~24].

이들의 연구는 희망적이긴 하지만 다른 연구자들의 뒷받침이 아직 거의 없고 늑막액과 같은 체액에서도 적용할 수 있을는지에 대해서 의문이 많다.

2. 분자생물학적 진단

최근 의학분야에서 분자 생물학의 발전은 감염질환의 진단에도 새로운 방법론으로 등장되고 있으며 특히 DNA 탐침(probe)을 보편적으로 사용할 수 있게 됨에 따라 좀더 신속한 진단이 가능하게 되었다. DNA 탐침을 이용하여 검출하는 방법중에서는 교잡(hybridization)방법이 흔히 사용되고 있으며, 동위원소가 label된 탐식자로 검정할 경우 매우 예민도가 높아 target DNA의 양이 1 pg 수준에서도 검출할 수 있으나 동위원소를 이용한 탐침들은 오랫동안 보관하기 어렵고 폐기물 처리에 번거로움이 있으며, 자가방사 사진술로 확인하기 까지의 많은 장비와 시간소요등의 문제점들이 뒤따른다.

최근 동위원소를 사용하지 않고 biotinylated probe나 chemiluminescence를 이용한 탐침등으로 검출하고 있으나 동위원소가 label된 탐침에 아직 미치지 못하고 있고, 임상검체에 존재하는 단백질이나 탄수화물들이 교잡반응에 영향을 미치기 때문에 임상검체에서 직접 증명하는 것은 예민도가 훨씬 떨어진다. 또한 target DNA가 미량일 경우에는 이상의 방법으로 검출할수 없기 때문에 이를 극복하기 위하여 세균을 사용하지 않고 단시간내에 시험관 내에서 손쉽게 원하는 유전자의 제한된

부위를 증폭시킬 수 있는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; 이하 PCR)이 1988년 Saiki 등[25]에 의해 처음 소개된 이래 그 방법이나 응용범위가 매우 빠른 속도로 발전되고 있다.

1) 핵산탐침법

결핵균의 특이한 DNA 또는 RNA를 확인하기 위해 방사성 동위원소를 붙인 탐침으로 교잡 시키는 방법이 주로 많이 사용되고 있다. 현재 M. tuberculosis, MAI (M. avium-M. intracellulare) complex에 대한 rRNA를 표적으로 하는 DNA 탐침이 상품화되어 사용되고 있다(Gen-Probe, San Diege). BACTEC 배양액을 Gen-Probe 핵산탐침법으로 동정한 결과를 보면 예민도 90%이상, 특이도 100%를 나타내고 있으나[26,27] 균수가 적은 임상검체에 대한 응용에 대해서는 아직 미지수이다. 탐침을 사용하지 않고 균의 DNA를 제한효소로 자른후 실시한 gel electrophoresis에서 나타나는 DNA 분절의 크기를 비교하는 방법(restriction frgment length polymorpism; RFLP)도 알려져 있으며[27,28,29,30] IS 986과 같은 결핵에만 특이적으로 나타나는 분절을 표적으로 DNA 탐침을 사용하기도 한다[31]. 그러나 이 방법도 균을 배양한 후에만 가능하다.

2) 중합효소연쇄반응을 이용한 방법

결핵균은 세포벽에 지질이 풍부한 항산균으로 같은 종(species)에서도 배양조건이나 균주(strain)에 따라 형태와 생합성능력에 차이가 나므로 DNA 수준에서 증명하는 것이 가장 좋은 방법으로 생각되고 있다. 그러나 결핵균에서 DNA를 추출하는 것은 세포벽의 불투과성 때문에 대단히 어렵다. 과거에는 주로 세포 파괴 방법을 사용하였기 때문에 DNA가 손상되기 쉬었으나 1986년 patel등[32]이 유기용제를 이용하여 세포벽의 지질성분을 제거한 후 단백분해효소와 lysozyme등으로 세포벽을 침투시킬수 있게 됨에 따라 결핵균의 DNA를 손상받지 않고도 추출할 수 있게 되었다. 또한 bead beating 방법도 사용될 수 있으며 추출과정에서 염이 생성되는 경우에는 gene cleaning 방법을 이용할 수도 있다. 그러나 결핵균에서 DNA를 추출하는 과정은 아직 정립되어 있지 않아 연구과제로 남아있다.

중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균의 검출은 Hance[33]에 처음으로 보고되었다. 결핵균의 65 kD 항원을 coding 하는 DNA중 383 bp의 분절을 증폭하여 높은 예민도를 보였지만 결핵균과 비정형 항산균의 감별은 되지 않으며 383 bp의 분절중에서 249~266번 사이 염기배열을 표적으로 southern blotting을 하면 감별이 가능하다고 하였다. Patel등[34]은 pMTb4 중에서 만든 primer로 증폭시키면 결핵균과 비정형항산균의 감별이 가능하다고 보고하였고 Hermans등[35]은 pPH 7301의 2.4 Kb DNA insert 중 결핵균에 특이한 158 bp의 분절을 발견하여 사용하였다. Pao등[36]은 65 kD 항원을 coding 하는 165 bp의 분절, Eisenach등[37]은 결핵균의 특이한 3개의 DNA 분절중 123 bp의 분절, Sjôbring등[38]은 38 kD 항원을 coding 하는 419 bp 분절, Wit등[39]은 336 bp의 분절, Shankar등[40]은 MPB 64 단백을 coding 하는 240 bp의 분절을 사용하였다. Pierre등[41]은 Hance 등이 사용한 383 bp의 분절을 증폭한 후 nested primer로 재증폭시켜 예민도를 높일수 있었다고 보고하였다.

각 연구자들의 연구결과를 보면 Patel 등은 모든 결핵균주에서 양상을 보였고 Pao 등은 전체적으로 예민도 100%, 특이도가 62.6%라고 발표하였다. Hermans 등은 예민도가 Hance 등의 연구보다는 나을 것이나 DNA 추출과정이 아직 미흡하다 하였고 특이도는 결핵균 46균주중 41 균주에서 양성, 비정형항산균 45균주에서는 나타나지 않았으며 Eisennach 등은 M. tuberculosis 이외에 M. simiae에서도 양성으로 나타남을 보고하였다.

이와같이 예민도가 높은데 대해서는 모두 인정하고 있으나 특이도에 아직 문제가 있음을 알수 있으며 현재까지는 어떤 primer를 사용해야 가장 좋은 것인지에 대해서는 확실하지 않다.

최근 nested primer를 이용한 PCR로 임상검체에 대한 실험결과를 보면 예민도 63%, 특이도는 91%이었다.

PCR를 시행하는 데는 heat denaturation, anneling, extension의 세가지 단순반응을 계속적으로 반복하여 DNA의 양을 증폭하게 되는데 보고자에 따른 차이가 많아 각 실험실에서는 실험조건의 변화에 따라 적절히 조

절하지 않으면 안된다.

PCR로 증폭후의 분석은 시료를 동위원소와 digoxigenin등으로 혹은 단순하 ethidium bromide 염색으로 검정하게 된다. 일반적으로 DNA는 결핵균 0.2개에 해당하는 1 fg 수준까지 가능하나 결핵균의 갯수로는 동위원소나 digoxigenin을 이용한 탐식자로 검정한 경우에 수십개가 존재하여야 하고 단순히 ethidium bromide 염색을 한 경우에는 1,000개 이상이 있어야 가능하다.

동위원소를 이용한 탐침들은 취급에 따른 여러가지 문제점들로 실제로 대부분의 병원에 있는 실험실에서는 사용하기 어렵고 digoxigenin을 이용한 탐침은 임상검체에 존재하는 단백질이나 탄수화물등이 교잡 반응에 영향을 미쳐 임상검체에서 직접 증명하는 것은 예민도가 훨씬 떨어지게 된다. 그러므로 ethidium bromide 염색만으로 검정하려 한다면 예민도를 높이기 위해 nested primer를 이용한 PCR도 하나의 방법이 될 수 있을 것이나 DNA의 오염을 더욱 유의하여야 한다.

이상에서 언급한 바와 같이 결핵균을 증명하는 데는 임상검체를 다루는 기법, 결핵균의 용해방법, DNA의 정제(purification)등의 여러가지 제한요소들과 함께 PCR을 시행하는 온도, 온도변환시간, primer 농도, 효소 및 DNA의 양에 따라 차이가 날뿐 아니라 양성시료에 의해 이 증폭된 DNA가 오염될 우려가 있으므로 매우 유의하여야 한다[42,43].

뇌척수액이나 말초혈액등 결핵균이 소수만 존재하는 검체에서 PCR로 결핵균의 DNA를 증명하는것은 매우 신속하고 비침습적인 좋은 방법이지만 PCR의 높은 예민도는 장점과 동시에 단점도 될 수 있다. 예를들어 결핵이 의심되어 치료받고 있는 환자에서 얻은 검체가 배양검사는 음성이고 PCR에서는 양성으로 나왔다면 이는 실험실에서 배양되기 힘든 결핵균을 환자가 아직도 갖고 있다는 것을 말하며 치료 실패를 의미하는 것은 아니기 때문이다.

우리나라에서도 중합효소 연쇄반응을 이용한 결핵의 진단에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며[44~49] 앞으로 예민도와 특이도를 높여 간단히 조그만 실험실에서도 사용하기 위해서는 많은 노력과 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) 홍영균 : 결핵의 역학-전국 실태조사 성적을 중심으로. 대한의학협회지 **34**(2):468-476, 1991
2) Bates JH, Brennan PJ, Douglas GW, Feeley JC, Glassroth J, Kohne DE, Martin WJ, Wayne LG, Zeiss CR: Improvements in the diagnosis of tuberculosis. Am Rev Respir Dis **134** (Suppl 2):415-423, 1986
3) Kirihara JM, Hillier SL, Coyle MB: Improved detection times for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis with the BACTEC radiometric system. J Clin Microbiol **22**:841-845, 1985
4) American Thoracic Society: Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am Rev Respir Dis **142**:725-735, 1990
5) Grange JM: The rapid diagnosis of pancibacillary tuberculosis. Tubercle **70**:1-4, 1989
6) Daniel TM: Antibody and antigen detection for the immunodiagnosis of tuberculosis; why not? what more is needed? where do we stand today? J Infect Dis **158**:678-680, 1988
7) Daniel TM: Rapid diagnosis of tuberculosis; Laboratory techniques applicable in developing countries. Rev Infect Dis **11** (Suppl 2) 471-477, 1989
8) Nassau E, Parsons ER, Johnson GD: The detection of antibodies to mycobacterium tuberculosis by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tubercle **57**:67-70, 1976
9) Daniel TM, Debanne SM: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Am Rev Respir Dis **135**:1137-1151, 1987
10) Kalish SB, Radin RC, Phair JP, Levitz D, Zeiss CR, Metzger E: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. J Infect Dis **147**:523-530, 1983
11) Balestrino EA, Daniel TM, de Latini MDS, Latini OA, Ma Y, Scocozza JB: Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. Bull WHO **62**:755-761, 1984
12) Ma Y, Wang YM, Daniel TM: Enzyme-linked im-

munosorbent assay using Mycobacterium tuberculosis antigen 5 for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in China. Am Rev Respir **134**:1273-1275, 1986

13) Ivanyi J, Krambovitis E, Keen M: Evaluation of a monoclonal antibody (TB72) based serological test for tuberculosis. Clin Exp Immunol **54**:337-345, 1983
14) Strauss E, Wu N: Radioimmunoassay of tuberculoprotein derived from mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA **77**:4301-4304, 1980
15) Strauss E, Wu N, Quraishi MAH, Levine S: Clinical applications of the radioimmunoassay of secretory tuberculoprotein. Proc Natl Acad Sci USA **78**:3214-3217, 1981
16) Kadival GV, Samuel AM, Virdi BS, Kale RN, Ganatra RD: Radioimmunoassay of tuberculous antigen. Indian J Med Res **75**:765-770, 1982
17) Yanez MA, Coppola MP, Russo DA, Delaha E, Chaparas SD, Yeager H Jr: Determination of mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunoassay. J Clin Microbiol **23**:822-825, 1986
18) Raja A, Machicao AR, Morrissey AB, Jacobs MR, Daniel TM: Specific detection of Mycobacterium tuberculosis in radiometric cultures by using an immunoassay for antigen 5. J Infect Dis **158**:468-470, 1988
19) Sada E, Ruiz-Palacios GM, Lopez-Vidal Y, Ponce de Leon S: Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunoassay for mycobacterial antigens. Lancet **2**:651-652, 1983
20) Bal V, Kamat RS, Kamat J, Kandoth P: Enzyme-linked immunosorbent assay for mycobacterial antigens. Indian J Med Res **78**:477-483, 1983
21) Krambovitis E, McIllmurray MB, Lock PE, Hendrickse W, Hoizel H: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by latex particle agglutination. Lancer **2**:1229-1231, 1984
22) Chandramuki A, Allen PRJ, Keen M, Ivanyi J: Detection of mycobacterial antigen and antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis. J Med Microbiol **20**:239-247, 1985
23) Kadival GV, Mazarelo TBMS, Chaparas SD: Sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of antigen in tuberculous meningitis cerebrospinal fluids. J Clin Microbiol **23**:901-904, 1986
24) Kadival GV, Samuel AM, Mazarelo TBMS, Chaparas SD: Radioimmunoassay for detecting mycobacterium tuberculosis antigen in cerebrospinal fluids of patients with tuberculous meningitis. J Infect Dis **155**:608-611, 1987
25) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Millisk B, Erlich HA: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**:487-491, 1988
26) Drake TA, Hindler JA, Berlin OGW, Bruckner DA: Rapid identification of Mycobacterium avium complex in culture using DNA probes. J Clin microbiol **25**:1442-1445, 1987
27) Kiehn TE, Edwards FF: Rapid identification using a specific DNA probe of Mycobacterium avium complex from patients with acquired immunodefiency syndrome. J Clin Microbiol **25**:1551-1552, 1987
28) Collins DM, Lisle GW: BCG identification by DNA restriction fragment patterns. J Gen Microbiol **133**:1431-1434, 1987
29) Patel RJ, Kvach JT, Mounts P: Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. J Gen Microbiol **132**:541-551, 1986
30) Shoemaker SA, Fisher JH, Jones WD, Scoggin CH: Restriction fragment analysis of chromosomal DNA defines different strains of Mycobacterium tuberculosis. Am Rev Respir Dis **134**:210-213, 1986
31) Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, Sohuitema ARJ, McAdam RA, Catty D, Van Embden JDA: Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: A useful Tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol **28**:2051-2058, 1990
32) Patel R, Kvach JT, Mounts P: Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. J Gen Microbiol **132**:541-551, 1986
33) Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebaultv, Lecossier D, Ranzier J, Bocort D, Gicquel B: Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol **3**:843-849, 1989
34) Patel RJ, Fries JW, Piessens WF, Wirth DF: Sequence analysis and identification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol **28**:513-518, 1990
35) Hermans PW, Schuitema ARJ, Soolingen DV, Verstynen C PHJ, Bik EMO, Thole JER, Kolk AH, van Embden JDA: Specific detection of mycobacteria

tuberculous complex strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol **28**:1204-1213, 1990

36) Pao CC, Benedict Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH: Detection and identification of mycobacteria tuberculosis by DNA amplification. J Clin Microbiol **28**:1877-1880, 1990

37) Eisenach KD, Donald Cave M, Bates JH, Crawford JT: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacteria tuberculosis. J Infect Dis **161**:977-981, 1990

38) Sjôbring ULF, Mecklenburg M, Andersen AB, Miôrner H: Polymerase chain reaction for detection of mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol **28**: 2200-2204, 1990

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

40) Shankar P, Manjunath N, Monan KK, Prasad K, Shriniwas MB, Ahuja GK: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Lancet **337**:5-7, 1991

41) Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P and Hance AJ: Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of mycobacteria tuberculous in clinical samples by amplification of DNA. J Clin Microbiol **29**:712-717, 1991

42) Peter JB: The polymerase chain reaction: amplifying our options Rev Infect Dis **13**:166-171, 1991

43) Persing DH: Polymerase chain reactions: Trenches to benches. J Clin Microbiol **29**:1281-1285, 1991

44) 윤경한, 이태윤, 조상래, 김득순, 정동현, 김주덕 : 가검물내 결핵균 검출에 있어서 DNA 분리방법에 따른 중합효소 연쇄반응의 민감도 비교. 대한미생물회지 **26**(2):159-166, 1991

45) 김호중, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철 : Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 결핵균의 진단에 관한 연구(초록). 결핵 및 호흡기질환 **37**:468, 1990

46) 한인권, 문인걸, 윤기혈, 유지홍, 강홍모 : Polymerase chain reaction을 이용한 객담내 결핵균 검출의 예비 실험(초록). 결핵 및 호흡기질환 **37**:468-469, 1990

47) 조상래, 이태윤, 윤경환, 정윤섭, 김주덕 : 중합효소 연쇄반응을 이용한 가검물내 Mycobaterium tuberculosis의 검출. 대한미생물학회지 **25**(6):491-499, 1990

48) 신완식, 양일호, 한치화, 박종원, 강문원, 박성학, 김춘추, 김동집, 정희영, 김상재 : 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균의 증명(초록). 제 42 차 대한내과학회 추계학술대회 초록집 p233, 1990

49) 김우주, 권소영, 변관수, 김경로, 이창용, 박승원 : 뇌척수액 및 흉막삼출액에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 결핵균의 증명(초록), 제 43 차 대한내과학회 추계학술대회 초록집 p72, 1991