

## 경부 결핵성 임파선염 환자에서 PCR-RFLP를 이용한 결핵균의 검출 및 확인

계명대학교 의과대학 병리학교실, 경북대학교 의과대학 이비인후과학교실\*  
이상숙 · 조영록 · 전지민 · 최용석 · 손은주 · 박남조 · 박준식\*

= Abstract =

### Detection and Identification of *Mycobacterium Tuberculosis* in Patients with Tuberculous Cervical Lymphadenitis by PCR-RFLP

Sang Sook Lee, M.D., Young Rok Cho, M.D., Ji Min Chun, M.D.,  
Yong Seok Choi, Eun Ju Sohn,  
Nam Cho Park, June Sik Park, M.D.\*

Department of Pathology, School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea  
Department of Otolaryngology,\* University School of Medicine, Kyungpook National,  
Taegu, Korea

Tuberculous cervical lymphadenitis is still an important cause of neck mass in Korea. Tuberculosis is an important differential diagnosis in patients of cervical lymphadenopathy. Rapid and sensitive test for the diagnosis of tuberculosis is essential for the appropriate treatment. Up to now, conventional diagnostic methods for *M. tuberculosis* were acid-fast bacilli (AFB) stain and culture of *M. tuberculosis*. The direct microscopic examination of AFB by Ziehl-Neelsen stain is rapid, but often negative. The culture for *M. tuberculosis* is time-consuming, taking 4 to 8 weeks. Recently various methods to detect Mycobacterial DNA, including PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis have been reported.

Here we represent a simple method for the confirmation of *M. tuberculosis* and exclusion of the other *Mycobacterial* species by RFLP analysis and silver staining of polyacrylamide gel electrophoresis after nested PCR for a repetitive DNA sequence (IS986) specific for *M. tuberculosis* from fresh or paraffin-embedded biopsy specimens. This result leads us to conclude that this method is simple, rapid and possibly applicable to confirm *M. tuberculosis* and rule out the other *Mycobacteria* species from the clinical specimens in the clinical laboratories.

**KEY WORDS :** Polymerase chain reaction (PCR) · Restriction fragment length polymorphism (RFLP) · *Mycobacterium tuberculosis*.

## 서 론

한국에서 현재 X-ray 검사상 증명된 활동성 결핵의

유병율이 1.84%로서 비교적 높으나 부적절한 치료로 인  
해 재발율이 매우 높은 실정이다<sup>1)</sup>. 최근까지 감소하는  
경향을 보였으나 최근, 고령의 노약자나 AIDS 등으로 인

해 번역이 저하된 사람에서 각종 *Mycobacteria*에 의해 감염성 질환이 증가되고 있어 주목을 끌고 있다<sup>6)</sup>.

한국에서 경부의 종괴를 주소로 내원하는 환자의 상당수는 결핵으로 야기되는 경우가 많아 결핵이 경부종괴를 일으키는 질환의 감별 진단에 중요한 위치를 차지한다<sup>1)</sup><sup>21)27)</sup>. 이 경우 *M. tuberculosis*의 빠른 확인과 신속한 치료의 시작이 환자가 합병증 없이 회복되고 장기적인 후유증을 피하는데 가장 중요하다<sup>1)</sup>. 이에 신속하고 특이도와 민감도가 높은 결핵의 진단 및 각종 *Mycobacterium* species간의 감별이 필요하다. 결핵을 진단하는데 흔히 사용하는 항산균 도말법은 신속하나 그 특이도가 낮고, *M. tuberculosis* 배양법은 특이도 및 민감도는 높으나 평균 4~8주를 요한다. 그 외 다양한 방법들이 시도되었으나 비싼 검사비와 복잡한 검사방법 때문에 좋은 성과를 거두지 못하여<sup>12)31)</sup> 보다 단순화되어 신속한 결과를 보고할 수 있고 경제적이며 예민도가 높은 *M. tuberculosis* 검출로 빠른 시간 내에 결핵을 진단할 수 있는 진단방법이 요구되고 있다. 이에 최근 유전자 기술의 진보로 *M. tuberculosis*의 여러 항원들의 유전자가 클론화되고 그 염기 배열이 밝혀졌으며<sup>18)25)</sup> DNA만을 시험관내에서 대량으로 증폭할 수 있는 중합효소 연쇄반응방법이 개발되어<sup>30)</sup> DNA의 증폭에 의하여 *M. tuberculosis*의 존재를 확인하는 연구가 행하여지고 있다.<sup>3-5)7)9)10)13)14)17)19)23)25)26)28)32)36)</sup> *M. tuberculosis*의 IS986은 enterobacteria의 IS3-like family의 insertion sequences와 상당한 homology를 공유함이 밝혀졌고 *M. tuberculosis*의 염색체에 여러 개의 copy가 존재함이 알려져 왔다. IS986은 *M. tuberculosis* complex 군주에만 유일하게 발견되어 이 element가 임상자료에서 PCR의 유용한 표적이 되어 임상에서 *M. tuberculosis*를 신속하고 정확하게 감지할 수 있어 결핵의 진단과 역학을 이는데 매우 적합한 도구임이 알려져 있다<sup>18)</sup>.

염색체 DNA의 제한효소에 의한 분석은 *M. tuberculosis*를 포함한 여러 세균의 감별과 분류에 사용되어 왔다<sup>8)15)16)22)24)29)33-35)37)</sup>. 이에 저자들은 결핵의 확인을 위하여 신선한 임파선 조직과 파라핀 포매조직을 대상으로 nested PCR에 의한 188bp의 DNA를 증폭한 후 증폭한 DNA분절의 염기 배열을 결정 한 후 *Bst* UI, *Hae* III와 *Hha* I 효소를 이용한 소화과정을 거친 후 restriction fragment length polymorphism(RFLP)을 은염색에 의해 그 패턴에 의해 *M. tuberculosis*를 확인하고 또한

다른 종의 *Mycobacteria*를 배제시킬 수 있었다.

본 방법은 1~2일에 끝나며, 방사선물질을 사용하지 않으면서도 감도 및 특이성이 우수하여 일반 병리실험실에서도 *M. tuberculosis*를 포함한 각종 *Mycobacteria* 군주의 신속한 검출법으로 손쉽게 사용할 수 있다고 생각되어 이에 보고하고자 한다.

## 대상 및 방법

저자들은 임상증상 및 병리조직소견 등을 근거로 경부 결핵성 임파선염이 의심되어 1992년 6월부터 1994년 6월까지 병리조직 검사가 의뢰된 34예의 임상검체의 신선한 생검 조직이나 파라핀 포매조직을 대상으로 하였다. 연구 대상 34명중 남여비는 1:2.1로 평균 31세(4~73세)로 젊은 여자에서 호발하였다. 전 예에서 병리조직학적으로 건락괴사, 유상피육아종, Langhans 거대세포 소견중 일부 또는 전부를 보였다. 그중 거락괴사를 보인 경우는 28예(82.4%), 유상피육아종을 보인 경우는 31예(91.2%), Langhans 거대세포를 보인 경우는 27예(79.4%)였다. 전 예에 2개이상의 소견을 보였다.

양성대조군은 배양으로 얻어진 *M. tuberculosis* 균주를 사용하였고 음성대조군으로 만성염증 등으로 수술한 10예의 파라핀 블록을 사용하였다.

사용한 PCR 방법은 아래에 기술된 바와 같다.

### 1. DNA 추출

조직 처리의 일반 과정인 formalin 고정 후 paraffin으로 포매된 생검조직 혹은 수술조직으로부터 박편절단기를 사용하여 7µm 두께로 3~4조각의 조직편을 분리하여 1.5ml Eppendorf tube(E-tube)에 담았고, 이 때 시료들간의 상호오염을 방지하기 위하여 조직절단에 사용한 칼날은 1회용으로 사용하였으며, knife holder는 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. 신선한 조직은 각 변 1mm의 부피로 절단하여 2~3조각을 취하였다. 이후 같은 조건으로 100µl의 digestion buffer(50mM tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20)에 부유한 후 200µg/ml 농도로 proteinase K(Kodak)를 가하여

37°C 수조에서 하루밤 동안 소화시켰다<sup>30)</sup>. 다음날 spin-down 30초후 끓는 물 속에서 9분간 둔 후, 다시 spin-down 30초후 그 상층액을 PCR 반응에 사용하였다.

## 2. PCR 과정

반응액 총량을 50 $\mu$ l로 하여 reaction buffer(KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH9.0 at 25°C, 0.1% Triton X-100), 각각 200 $\mu$ 씩의 dNTPs(Promega, U.S. A.), MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, primer(한국생공) 각 0.1 $\mu$ M씩, 1unit의 Taq DNA polymerase(Promega)를 증류수로 혼합하여, 94°C 2분간 초기변성 과정을 거친 후 94°C 20초, 65°C 20초, 72°C 45초를 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 시간조건을 같이한 nested PCR을 시행하였으며, 다만 MgCl<sub>2</sub>의 농도를 1차에는 1.5mM이었던 것을 2차에는 2.0mM로, 그리고 template DNA 양을 1차에는 추출물 10 $\mu$ l을 2차에서는 1차 PCR 반응 산물 2 $\mu$ l로 조정, 전체 반응량을 증류수로 맞추었다. 참고로, buffer와 MgCl<sub>2</sub>는 polymerase를 구입할 때 같이 포장되어 들어온 Promega 제품을 사용하였다. 음성대조군으로서 시료의 DNA대신에 증류수를 사용하였고, 양성대조군은 동산병원 세균학실에서 배양 후 *M. tuberculosis*로 진단된 균주를 신선한 조직과 같은 방법으로 DNA를 추출하여 사용하였다. 실험의 전 과정에서 DNA 추출과 PCR 및 판독을 위한 전기 영동과정을 모두 각각의 다른 방에서 시행하였다.

사용한 primer는 IS986의 245bp(1차)와 188bp(2차)를 표적 DNA로 하여<sup>18)</sup> 한국생공에 의뢰하여 제작하였으며 그 서열은 다음과 같다.

First round : 245bp

P1(ISN1, 20mer) 5'-CGT-GAG-GGC-ATC-GAG-GTG-GC-3'

P2(ISN2, 20mer) 5'-GCT-TAG-GCG-TCG-GTG-ACA-AA-3'

Second round : 188bp

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 10  $\mu$ l를 취하여 gel loading buffer와 혼합하여 1.35% gel(Agarose 0.7% Kodak, Synergel 0/56% Diversified Biotech)에 전압 100V로 20분간 영동하였다. Size marker는 GibcoBRL사의 100bp 짜리를 사용하였고, buffer는 gel 제조와 전기 영동에 모두 1X TAE를 사용하였다. Gel 제조 과정 중 전자렌지에서 끓인 후 꺼내어 DNA 염색용 Ethidium bromide(0.4 $\mu$ g/ml)용액을 첨가 후 plate에 부어 실온에서 약 1시간동안 굳혔다. 그리고, 320nm의 자외선으로 판독 후 Polaroid 사진으로 촬영하여 결과를 남겼다.

## 4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

DNASIS라는 컴퓨터 검색 프로그램을 이용하여 Gene Bank database 자료를 검색하여 *M. tuberculosis*의 염기 서열에 존재하는 제한효소를 찾아 그 절단 부위의 위치와 염기서열을 조사하였다. 그중 증폭된 산물을 절단하여 전기영동으로 확인이 가능한 범위내에 존재하며 절단된 단편의 길이에 의해 두 단편의 다형성을 쉽게 확인할 수 있는 제한 효소를 선택하였다(Fig. 3). 총 반응량을 20 $\mu$ l로 하여, 2차 PCR 산물 15 $\mu$ l을 선택된 제한효소의 조건에 맞는 온도와 시간 및 농도로 소화시켰다. *Bst* UI은 60°C에서 10unit/ $\mu$ l로 4시간이상, *Hae* III는 37°C에서 10unit/ $\mu$ l로 2시간이상, *Hha* I은 37°C에서 12unit/ $\mu$ l로 1시간동안 충분히 소화시켰다. 충분한 소화과정을 거친 후 각 5 $\mu$ l씩을 역시 1.35% gel에 전기 영동하여 Polaroid로 촬영하여 기록을 남기고 소화정도와 DNA 농도를 조절하였다. 6% acrylamide gel(acrylamide 39 : bis-acrylamide 1)에 3 $\mu$ l 정도씩 전기영도에서 확인한 농도에 따라 양을 증감하여 400V에 70분간 영동하였다. 이 때의 buffer는 1X TBE를 사용하였으며, size marker는 100bp(GibcoBRL, Germany)와 *Hae* III로 자른 pBR322 DNA(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였다. 그 후 은염색(silver stain)을 시행하였으며 그 과정은 다음과 같다. 10% glacial acetic acid에 20분간 고정하였다. 그리고 이 고정액은 반응정지액으로 쓰기 위해 보관해 두었다. 증류수에 2분간 3번 헹군 후, 0.1% silver nitrate 용액에 30분간 염색하였다. 다시 증류수로 살짝 행구고, 3% sodium carbonate 용액에서 5~7분간 발색시켰다. 이 때에는 발색정도를 눈으로 확인해 가며 시간을 조절해야 하는데, 적당히 발색된 후 고정액으로

쓰고 보관해 둔 반응정지액을 함께 섞어 2~3분간 반응시킨 후, 증류수로 살짝 행군 다음, 뒷면에 흡수지를 붙이고 gel 건조기에서 75℃로 45분간 진공상태를 유지하며 건조시켰다. 완전히 건조되면 앞면에 주방용 wrap를 붙여서 판독 및 보관하였다.

### 성 적

연구 대상 34명중 남여비는 1:2.1로 연령은 평균

31세(4~73세)로 젊은 여자에서 호발하였다. 전 예에서 병리조직학적으로 건락괴사, 유상피육아종, Langhans 거대세포 소견중 일부 또는 전부를 보였다. 본 연구에서 신선한 생검조직과 포매조직에서 PCR법에 의해 각각 87.0%와 88.2%에서 결핵으로 판명되어 연구대상 전 예(100%)에서 188bp의 *M. tuberculosis*의 특이한 DNA 절편이 관찰되었다(Fig. 1). Nested PCR의 민감도는 계단 희석한 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv DNA를 *M. tuberculosis*의 IS986를 표적 DNA로 하여 nested PCR

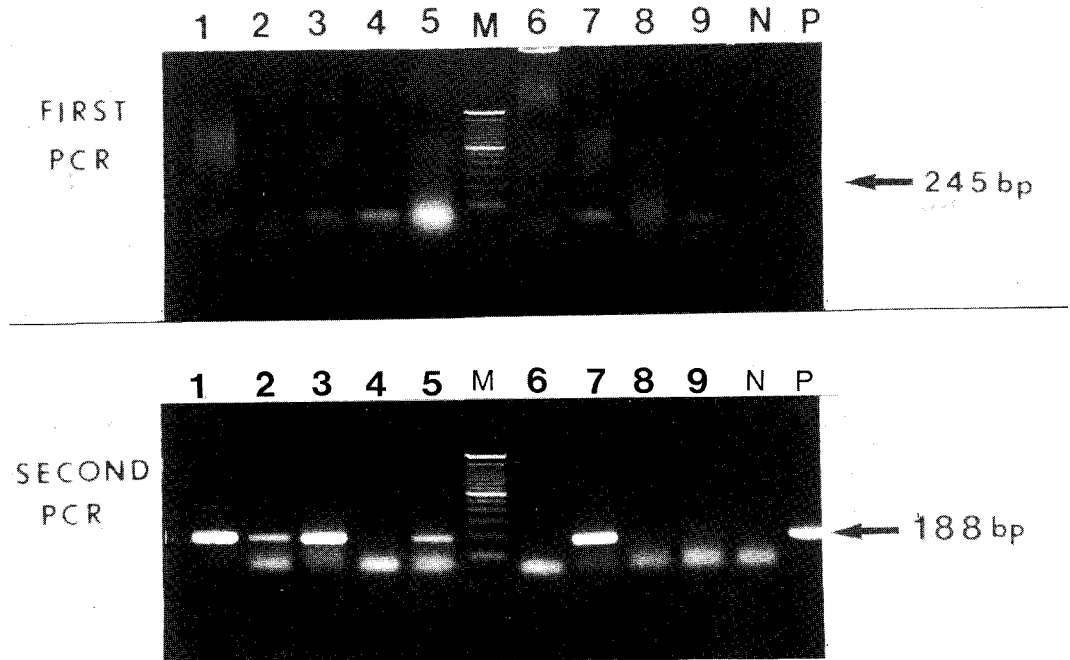


Fig. 1.



Fig. 2.

을 실시한 결과 0.5fg 이상에서 양성반응을 보였다(Fig. 2).

PCR 산물을 *Bst* UI은 60°C에서 10unit/μ로 4시간이상, *Hae* III는 37°C에서 10unit/μ로 2시간이상, *Hha* I은 37°C에서 12unit/μ로 4시간동안 충분히 소화시킨 후 전기영동 패턴을 검사한 결과 염기배열상 추측했던 DNA의 절단 모양과 실제 행한 전기영동상 절단 모양이 완전하게 일치하여 *M. tuberculosis*임을 확인함과 동시에 다른 *Mycobacteria* 종을 배제할 수 있었다. 본 연구에서 전기 영동을 행한 6% acrylamide gel(acrylamide 39 : bis-acrylamide 1)의 은염색(silver stain)을 시행하여 방사선 물질을 사용하지 않고서도 비교적 분명한 DNA의 절단 패턴을 인지하는 데는 충분하였다(Fig. 4).

## 고찰

경부 결핵성 임파선염 환자의 원인적 진단을 위해 기

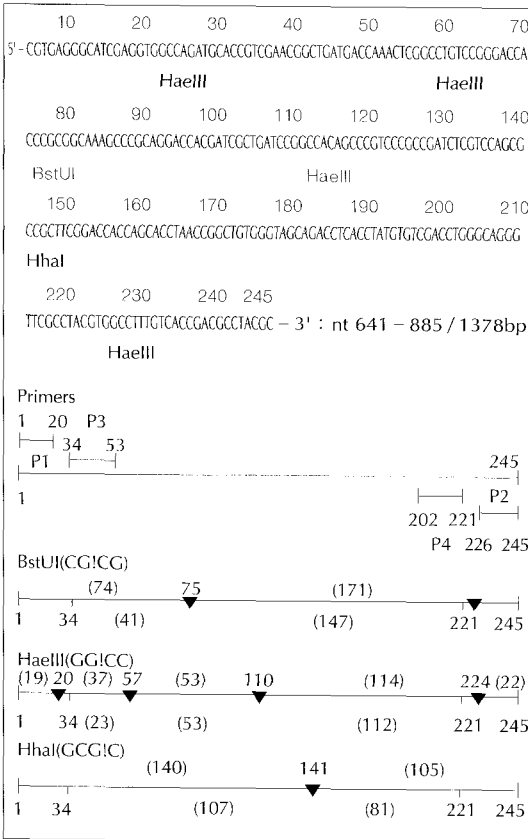


Fig. 3.

존의 항산균 도말법, 배양법 및 조직학적인 검사법등의 단점을 보완할 수 있는 진단법으로 최근 PCR을 이용한 *M. tuberculosis* 검출의 시도는 국내외적으로 활발하게 이루어지고 있다<sup>5) 7) 9) 10) 13) 14) 17) 19) 23) 25) 26) 28) 32) 36)</sup>. 또한 human immunodeficiency virus(HIV)로 감염된 환자의 증가와 함께 결핵을 비롯한 *Mycobacteria*에 의한 감염 빈도가 결핵을 진단하고 치료하는데 관심이 집중되고 있다<sup>6)</sup>. 결핵은 1차적으로 폐질환으로 간주되었으나 첫 폐감염동안 임파계와 혈행을 통해 확산되어 거의 모든 장기를 침범할 잠재력을 갖게 된다. 1984년 이후로 폐이외의 장기에 생긴 결핵이 폐결핵보다 더 빠른 속도로 증가하고 있으며 이것이 후천성 면역결핍증 환자의 진단하는 한 요건이 되고 있다<sup>11)</sup>.

저자들의 연구에서도 결핵의 진단에서 PCR방법에 의한 진단이 일반적으로 알려진 병리조직학적 소견이나 항산균 염색 양성율보다 훨씬 우수함을 알 수 있었다. 또한 파라핀 포매조직도 생체조직가검물에서와 마찬가지로 *M. tuberculosis* 동정에 중요한 자료로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 결핵이 의심되는 환자에 있어서 생검가검물 및 병소부 농가검물에서 항산균 도말법상 음성반응을 보이는 경우 PCR법을 시행함으로써 *M. tuberculosis* 검출에 있어 많은 도움을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

저자들이 proteinase K-chloroform법을 이용해 DNA를 검출하고 *M. tuberculosis*의 IS986를 표적으로 한 nested 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 임성이 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 가지고 있어 검사기간이 오래 걸리는 종래의 방법에 비해 매우 유용한 것으로 생각된다.

PCR-RFLP 분석의 원리<sup>16)</sup>가 이미 여러 균주의 감별 및 동정을 알아 보기 위하여 실시되고 있다<sup>15) 22) 34)</sup>.

저자들은 PCR-RFLP를 *Mycobacteria* 균주에 이용한다면 각 균주간에 상이한 염기 배열을 알고 이를 특이하게 절단하는 여러 종류의 효소를 잘 이용한다면 감별이 가능하리라고 생각되어 본 연구에서 시행하였다. 최근에

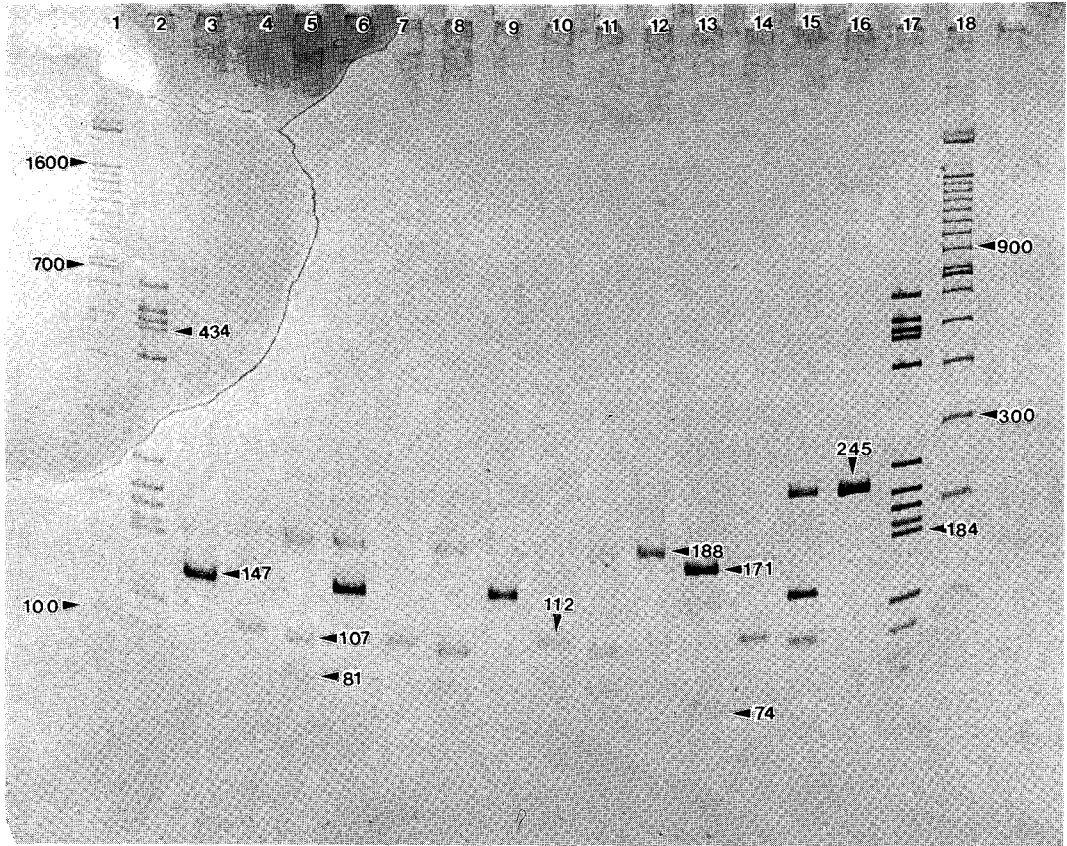


Fig. 4.

는 *Mycobacteria* 균주에 대한 PCR-RFLP에 대한 연구가 보고되어 있으나<sup>8)24)29)33)35)37)</sup> 또한 대부분의 연구에서 방사선 동위원소를 사용하고 있어 실제 일반 실험실에서 적용하기가 어려운 실정이다. 본 연구에서 사용한 젤의 은염색은 비교적 간편하여 방사선 물질로부터 보호될 수 있고 그 감도 또한 떨어지지 않아 권장할 만 하다고 생각된다. 본 연구에서 저자들은 이 방법에 의해 *M. tuberculosis*를 확인함과 동시에 다른 *Mycobacteria* 균주를 배제할 수 있었다. 각종 *Mycobacteria* 균주만 보강된다면 향후 PCR-RFLP에 의해 여러 균주를 동시에 검색할 수 있으리라 기대된다. 그리고 객담, 흉수, 복수뿐 아니고 신선한 조직이나 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 조직절편에서도 균을 동정할 수 있어 그 응용 범위가 제한이 없을 것이라 생각되며 DNA를 추출하고 PCR-RFLP과정과 함께 은염색으로 결과 판독까지 1~2일 정도 걸려 검사결과를 신속하게 임상 의사에게 제공할 수 있다. 균의 생사에 관련 없이 검출되므로 약제 투

여후의 검체나, 파라핀 조직표본 또는 생체까지 진단이 가능하므로 실제 공헌이 기대된다.

## 요 약

결핵의 진단은 특징적 병리조직양상, 항산균 염색에 의한 균 증명과 *M. tuberculosis*균 배양으로 이루어지나 형태적으로는 결핵이 의심되더라도 항산균이 조직표본이나 도말에서 검출되지 않거나 *M. tuberculosis*가 배양되지 않아 정확한 원인적 진단이 불가능할 경우가 많다. 이에 저자들은 경부 결핵성 임파선염으로 적출되어 보내어진 경부 임파선 조직의 신선한 조직이나 통상적으로 처리되어 제작된 파라핀 블록을 이용하여 *M. tuberculosis*에 특수한 반복성 DNA sequence인 IS986를 표적으로 한 primers를 사용하여 nested PCR 방법을 이용하여 예민도가 높은 *M. tuberculosis* 검출로 빠른 시간 내에 결핵을 진단하고자 본 연구를 실시하였다. 최근 유전자 기술의 진보

로 *M. tuberculosis*의 여러 항원들의 유전자가 클론화되고 그 염기 배열이 밝혀졌으며 이에 저자들은 결핵의 확진을 위하여 파라핀 포매조직을 대상으로 nested PCR에 의한 188bp의 DNA를 증폭한 후 증폭한 DNA분절의 염기 배열을 결정한 후 *Bst* UI와 *Hha* I 효소를 이용한 소화과정을 거친 후 restriction fragment length polymorphism(RFLP)을 은염색에 의해 그 패턴에 의해 *M. tuberculosis*를 확인하고 또한 다른 종의 *Mycobacteria*를 배제시킬 수 있었다. 본 방법은 1~2일에 끝나며, 방사선물질을 사용하지 않으면서도 감도 및 특이성이 우수하여 일반 병리실험실에서도 *M. tuberculosis*를 포함한 각종 항산균의 신속한 검출법으로 손쉽게 사용할 수 있다고 생각되어 이에 보고하였다.

## References

- 1) 김종규 · 이충환 : 경부 결핵성 임파선염, 대한두경부종양학술지 11 : 3-8, 1995
- 2) 보건사회부 : 결핵현황도(1990). 보건사회통계연보 38 : 12, 1992
- 3) 진창호 · 하경임 · 김정숙 외 4인 : 결핵 진단을 위한 중합효소연쇄반응의 임상적 응용. 대한임상병리학회지 13 : 445-459, 1993
- 4) 조상래 · 이태운 · 윤경환 · 정동현 · 정운섭 · 김주덕 : 중합효소연쇄반응을 이용한 가검물내 *Mycobacterium tuberculosis*의 검출. 대한미생물학회지 25 : 491-499, 1990
- 5) Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, et al : Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 338 : 364-366, 1991
- 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 gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol* 31 : 3270-3274, 1993
- 8) Collins DM, Lisle GW : DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* 130 : 1019-1023, 1984
- 9) 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
- 10) Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT : Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 161 : 977-981, 1990
- 11) Elder NC : Extrapulmonary tuberculosis. A review. *Arch Fam Med* 1 : 91-98, 1992
- 12) Ellner PD, Kiehn 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
- 13) 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
- 14) Fusegawa H, Miyachi H, Tsutsumi Y, et al : Rapid diagnosis of tuberculous lymphadenitis by amplification of *Mycobacterial* DNA. *Rinsho Byori* 40 : 891-895, 1992
- 15) Garcia MJ, Tabares E : Separation of *Mycobacterium gadium* from other rapidly growing mycobacteria on the basis of DNA homology and restriction endonuclease analysis. *J Gen Microbiol* 132 : 2265-2269, 1986
- 16) Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ : Forensic application of DNA 'fingerprint.' *Nature(London)* 318 : 577-579, 1985
- 17) Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frerault V, et al : Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of *Mycobacterial* DNA. *Mol Microbiol* 3 : 834-849, 1989
- 18) Hermans PW, Van Soolingen D, Dale JW, et al : Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* : A useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28 : 2051-2058, 1990
- 19) Hermans PW, Schuitema ARJ, van Soolingen D, et al : Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex stains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28 : 1204-1213, 1990
- 20) Hurley SS, Splitter GA, Welch RA : Rapid lysis technique for *Mycobacterial* species. *J Clin Mi-*

- crobiol* 25 : 2227-2229, 1987
- 21) 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
  - 22) Marshall RB, Wilton BE, Robinson AJ : *Identification of Leptospira serovars by restriction endonuclease analysis. J Med Microbiol* 14 : 163-166, 1981
  - 23) Narita M, Shibata M, Togashi T, et al : *Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis. Acta aediatr* 81 : 141-144, 1992
  - 24) Patel RJ, Vach JTK, Mounts P : *Isolation and restriction endonuclease analysis of Mycobacterial DNA. J Gen Microbiol* 132 : 541-551, 1986
  - 25) Patel RJ, Fries JW, Piessens WF, Wirth DF : *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
  - 26) 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
  - 27) Pinder SE, Colville A : *Mycobacterial cervical lymphadenitis in children : Can histological assessment help differentiate infections caused by nontuberculous Mycobacteria from Mycobacterium tuberculosis? Histopathology* 59-64, 1993
  - 28) Popper HH, Winter E, Höfler 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
  - 29) Reddi PP, Talwar GP, Khandekar PS : *Repetitive DNA sequence of Mycobacterium tuberculosis : Analysis of differential hybridization pattern with other Mycobacteria. Int J Lepr* 56 : 592-597, 1988
  - 30) Saiki RT, Scharf S, Faloona F, et al : *Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science* 230 : 1350-1354, 1985
  - 31) Schöningh 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
  - 32) Shawar RM, el-Zaatari FAK, Nataraj A, et al : *Detection of Mycobacterium tuberculosis in Clinical Samples by Two-Step Polymerase Chain Reaction and Nonisotopic Hybridization Methods. J Clin Microbiol* 31 : 61-65, 1993
  - 33) 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 Dis* 131 : 760-763, 1985
  - 34) Thiermann AB, Handsaker AL, Moseley SL, Kingscote B : *New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup Pomona by restriction endonuclease analysis : Serovar kennewicki. J Clin Microbiol* 21 : 585-587, 1985
  - 35) Whipple DL, Le Febvre RB, Andrews RE, Thiermann AB : *Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from Mycobacterium paratuberculosis and other Mycobacterium species. J Clin Microbiol* 25 : 1511-1515, 1987
  - 36) 楠伸治, 他 : PCRを用いた咯たん中の結核菌群およびMycobacterium属菌の連続検出. 感染症誌 66 : 1682-1691, 1992
  - 37) 日高恵以子, 他 : PCR-RFLPを用いた抗酸菌の検出および同定. 臨床病理 43 : 155-161, 1995