

완전 자동화된 액체배양법과 기존의 고체배양법을 이용한 객담 내 mycobacterium의 신속검출에 대한 비교

국립마산결핵병원 임상결핵연구센터, 연세대학교 의과대학 미생물학교실[#]

박승규, 김승철[#], 김득미, 이창운, 김 영, 조상래[#]

=Abstract=

Fully Automated Liquid Culture System Compared with Lowenstein-Jensen Solid Medium for Rapid Recovery of Mycobacteria in Sputums

Seung-Kyu Park, M.D., Seung-Chul Kim, Ph.D.[#], Deuk-Mi Kim, B.A.,
Chang-Woon Lee, B.A., Young Kim, Ph.D., Sang-Nae Cho, Ph.D.[#]

Clinical Research Center for Tuberculosis, National Masan TB Hospital, Masan, Korea
Department of Microbiology, Yonsei University Medical School[#], Seoul, Korea

Background : The Aim of this study was to compare the recovery of mycobacteria from sputum samples of pulmonary tuberculosis patients using the MB/BacT rapid culture system(Organon Teknika, USA) with that obtained using Lowenstein-Jensen solid medium.

Methods : The two culture systems were compared using sputum samples of 99 pulmonary tuberculosis patients. Culture media were incubated at 35-37°C for six weeks in the MB/BacT system and for 12 weeks in Lowenstein-Jensen solid medium. Solid media were examined macroscopically once a week, and the MB/BacT system positive vials were unloaded from the machine as soon as possible after positive signal from the connected computer was detected. Confirmation of growth for mycobacteria was done by Ziehl-Neelson stained smears. Isolates were identified to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* from mycobacterium other than tuberculosis(MOTT) by phenotypic and molecular methods.

Results : Of the sputum samples of the 99 patients, 58 samples were smear positive and 41 in negative smear. Mycobacteria were recovered from 67(67.7%) samples by using both culture systems.

[†]본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(HMP-00-CH-03-0001)

Address for correspondence:

Seung Kyu Park, M.D.

Clinical Research Center for Tuberculosis, National Masan TB Hospital

486, Gapo-dong, Masan city, 631-710, Korea

Phone : 055-249-3777 Fax : 055-242-1135 E-mail : pulmo@unitel.co.kr

The yield with MB/BacT was higher than that with Lowenstein-Jensen [67(67.7%) vs. 52(52.5%), $p<0.001$]. Moreover, 15(15.2%) samples were positive only in the MB/BacT, whereas none of samples was positive only in Lowenstein-Jensen. In smear-positive and smear-negative samples, the recovery rate with MB/BacT was also higher than that with Lowenstein-Jensen [sputum-positive; 56/58(96.6%) vs. 46/58(79.3%), $p=0.005$, sputum-negative; 6/41(14.6%) vs. 5/41(12.2%), $p<0.001$]. The mean times to detection of Mycobacteria were 13.3 and 27.2 days with MB/BacT and Lowenstein-Jensen respectively($p<0.001$).

Conclusions : This results indicate that the the MB/BacT is more efficient and faster than Lowenstein-Jensen for the recovery of mycobacteria. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:635-643)

Key words : MB/BacT, L-J medium, *M. tuberculosis*.

서 론

결핵은 전 세계적으로 여전히 심각한 보건문제로 연간 약 3백만 명이 결핵으로 사망하고 있으며 전 세계 인구의 1/3이 결핵에 감염되어 있는 실정이다. 게다가 최근 결핵발생율이 증가하고 있으며 이와 더불어 효과적인 항결핵제에 내성을 보이는 결핵균의 발현이 문제가 되고 있다. 이러한 경향에 따라서 보다 효과적이고 신속한 결핵진단기법과 개선된 항결핵 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있다¹⁻⁴.

지난 10여 년 동안 핵산증폭기법으로 임상검체에서 직접 신속하게 결핵균을 발견할 수 있는 기법들이 개발되었으며⁵⁻¹⁰ 특히 이러한 방법 중에는 polymerase chain reaction(PCR)법과 transcription-mediated amplication법 등이 있다. 하지만 결핵의 진단에서 이러한 진단방법들의 역할은 임상적 환경과 임상검체의 종류에 따라 다양하며, 증폭하고자 하는 대상과 검사기법에 따라서 그 효율성도 다양한 실정이다. 또한 도말음성인 객담과 객담 이외의 검체에서는 민감도가 낮은 것으로 보고되고 있다¹¹⁻¹⁴. 현재 미국의 경우 CDC(Center for Disease Control and Prevention, Georgia, USA)와

FDA(Food and Drug Administration)의 권고에 따라서 핵산증폭기법의 사용은 도말양성 검체에 국한하고 있다^{15,16}. 결과적으로 결핵의 검사실 진단은 새로운 핵산증폭기법이 소개되었음에도 불구하고 여전히 현미경 도말검사와 고체 및 액체배지를 이용한 결핵균 배양법에 의존하고 있으며 이러한 결핵균 배양법이 결핵진단의 기준(gold standard)이 되고 있는 실정이다¹⁷⁻¹⁹. 한 편 최근 CDC의 전문가지침에는 결핵균 동정에 필요한 시간을 검체 접종 후 14-21일로 공식화한 바 있으며, *Mycobacterium tuberculosis* complex의 동정을 위해서는 결과보고시간(turnaround time)이 21일을 넘지 않도록 추천하고 있다^{20,21}. 이는 임상검체에서 증폭된 핵산을 발견하거나, 액체배지를 이용함으로써 가능하다는 판단에서였다. 하지만 현미경 도말검사는 민감도가 높지 않으며^{22,23}, 기존의 고체배지를 이용한 배양법은 가격이 저렴하고 특이도가 높기는 하지만 신뢰할 만한 양성의 결과를 얻기 위해서는 검체 1ml당 1-5×10²개가 요구되며 접종 후 18일이 경과하기까지는 육안으로 결핵균의 발육을 거의 구분할 수 없기 때문에 4-8 주간의 시간이 소요된다²⁴.

최근 방사능물질을 폐기해야 하는 radiometric

system의 단점을 보완하면서 mycobacteria를 신속하게 발견하기 위한 몇 가지 새로운 진단기법이 개발되었다. 이 중 Becton Dickinson사에서 만든 fluorescence-based detection system인 Mycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT)960와 BACTEC 9000 MB가 있으며²⁷⁻²⁹, 균성장시 가스생성 혹은 소모로 인한 압력의 변화에 기초한 ESP culture system II³⁰(AccuMed, Chicago, Ill), 그리고 폐쇄된 시스템에서 mycobacterium 성장을 나타내는 colorimetric CO₂ 발견기구인 MB/BacT³¹(Organon Teknika, Turnhout, Belgium) 등이 있다. 이러한 검사기법들은 모두 액체배지를 이용하며, 완전 자동화되어 있어서 균성장을 거의 지속적으로 모니터링할 수 있으며, radiometric system의 또 다른 단점인 균배양 동안 병을 조작해야 하는 성가신 작업을 피할 수 있다.

본 연구의 목적은 폐결핵으로 진단된 후 치료중인 환자의 객담검체를 이용하여 MB/BacT culture system과 egg-based Lowenstein-Jensen(L-J) 고체배지의 균검출율과 결핵균의 동정에 소요되는 시간을 비교하고자 하였다.

대상 및 방법

대상 및 검체

2002년 1월 1일부터 2002년 6월 30일 사이에 본원에 입원 혹은 외래에서 폐결핵으로 치료중인 환자 127명의 객담검체를 이용하였으며, 배양 중 오염된 28개의 검체(MB/BacT system 18개, L-J배지 14개, 4검체는 두 배양법 모두에서 오염)를 제외한 99명의 객담검체를 대상으로 하였다. 폐결핵의 진단은 흉부 X-선 사진과 객담도말 및 배양검사결과를 근거로 하였다. 객담도말검사는 매월, 배양검사는 격월로 시행하며 대상환자 중 41명은 연구당시 도말검사상 균음전 직후였다.

검체접종

검체는 4% NaOH로 전처치한 후 4300rpm으로 20분간 원심분리한 후 침전물은 멸균된 phosphate buffer(pH 6.8)를 첨가하여 2ml로 만들어 MB/BacT bottle에 0.5ml, Lowenstein-Jensen배지에 0.25ml를 접종하였다.

MB/BacT system

최근 개발된 MB/BacT system은 검체접종 후 mycobacterium 성장에 따라 bottle안에 CO₂가 생성되면 녹색에서 노란색으로 변색되는 것을 bottle의 바닥에 부착된 colorimetric sensor가 지속적으로 CO₂를 발견하게 되어 있다. Bottles은 10ml의 변형(modified) Middlebrook 7H9 액체배지에 성장 인자가 첨가되어 있다. MB/BacT에 첨가되는 항생제(500µl)는 polymyxin B(10,000unit), amphotericin B(0.018% W/V), nalidixic acid(0.04% W/V), trimethoprim(0.00105% W/V), vancomycin (0.0005% W/V) 그리고 azlocillin (0.0034% W/V) 등으로 구성된 항생제카테일("MB/BacTTM Antibiotics Supplement Kit", Organon Teknika Corp.)을 포함하고 있으며, 검체를 접종하기 직전에 첨가하였다. 검체를 접종한 bottles을 배양시키는 MB/BacT장비의 각 구획에는 reflectometer와 발견장치(detection unit)가 포함되어 있다. 매 10분마다 bottle을 판독하고 측정된 수치는 컴퓨터에 전달되며 특별한 연산법에 근거하여 mycobacterium의 성장을 확인하게 된다.

배양과정

농축된 각 검체 중 0.25ml을 L-J media에 접종하고, 0.5ml는 MB/BacT bottles에 접종하여 37°C에서 8주간 배양시켰다. 검체가 접종된 L-J 배지는

37°C에서 배양시켰으며 첫 4주간은 주 2회, 그리고 그 후 8주까지는 주 1회 mycobacterium의 성장 혹은 오염 유무를 검사하였다.

균동정(identification of isolates)

L-J 고체배지에 균성장이 육안으로 확인되거나, 혹은 MB/BacT bottles에서 균성장이 확인되면 Ziehl-Neelsen(ZN) 염색법으로 항산균 도말검사를 시행하여 항산균의 존재를 확인하였다. 배양된 모든 균주는 colony의 형태와 niacin생성여부를 확인하였으며, 한 번의 조작으로 mycobacteria속 특이적 염기서열 및 결핵균종 특이적 염기서열을 증폭 시킴으로 결핵균과 비결핵 마이코박테리아의 감별 진단이 가능한 probeTM Mycosignal PCR Premix를 이용하였다.

오염확인

액체배지 배양방법에서의 오염은 집균도말과 분자 생물학적 방법으로 발견하였다. 만약 MB/BacT process bottle에서 균액을 꺼내어 ZN도말염색법에서 음성이고 mycobacteria속 특이적 염기서열을 보이지 않으면 오염된 것으로 판단하고 폐기하였다. 고체배지오염은 ZN도말염색법과 사면이 mycobacterium의 성장을 지탱할 수 있는 지 여부로 판단하였다. 즉, 고체배지사면의 절반이상이 ZN도말염색법상 음성인 균의 성장을 보이면 오염된 것으로 판단하고 폐기하였다.

통계처리

2가지 배양방법의 결핵균 동정율(recovery rate)과 발견시간을 χ^2 test와 student's *t*-test를 이용하여 차이점의 유의성을 각각 조사하였다.

Table 1. Comparison between L-J media and MB/BacT culture system from sputum samples of 99 pulmonary tuberculosis patients

	L-J media		Total
	(+)	(-)	
MB/BacT	(+)	52	67
	(-)	0	32
Total		52	47
			99

결 과

MB/BacT system과 L-J배양법 중 어느 한 방법에서 균성장이 발견된 검체는 67개(67.7%)였다. 두 배양법 모두에서 균성장이 발견된 검체는 52(52.5%)개였으며, MB/BacT에서만 발견된 검체는 15개(15.2%)였으나 L-J배양법에서만 발견된 경우는 없었다(Table 1).

객담검체의 ZN염색법으로 항산균 집균도말검사상 양성인 검체는 58개, 음성인 검체는 41개였다. 58개의 도말양성 검체 가운데 MB/BacT system에 양성을 보인 검체는 56개(96.6%), L-J배지양성은 46개(79.3%)였으며($p=0.005$), 균성장 평균 발견시간은 각각 11.0일과 23.5일이었다($p=0.001$). 41개의 도말 음성 검체 가운데 MB/BacT system에 양성을 보인 검체는 11개(26.8%), L-J배지양성은 6개(14.6%)였으며($p<0.001$), 균성장 평균 발견시간은 각각 13.7일과 27.6일이었다($p=0.002$). 전체적으로 MB/BacT system과 L-J배양법에서 균성장 발견시간은 각각 13.3 ± 8.3 일, 27.2 ± 10.9 일이었다($p<0.001$)(Table 2).

고 찰

결핵의 확진을 위해서는 여전히 배양배지에서 *Mycobacterium tuberculosis* complex의 동정이 요구된다. 이런 점에서 Bactec radiometric system과 Septi-Chek AFB system은 기존의 고체배지에

Table 2. Comparison of culture rate and positivity detection time between L-J media and MB/BacT system

Sputum smear	L-J media		MB/BacT	
	No.(%)	mean days	No.(%)	mean days
+				
(n=58)	46(79.3%)	23.5	56(96.6%)	11.0
-				
(n=41)	6(14.6%)	27.6	11(26.8%)	13.7
	52(52.5%)	27.2±10.9	67(67.7%)	13.3±8.3

비해 민감도가 높고, 양성판정까지 소요되는 시간이 훨씬 단축되어 도말양성과 음성 객담검체에서 결핵균을 발견하는 시간이 평균 50%정도 짧아졌으며^{25,26}, *Mycobacterium tuberculosis*의 동정을 위해 접종 후 14-21일이 소요될 것을 제시한 CDC의 기준에 맞는 유일한 배양방법들로 인식되어 왔다. 하지만 이러한 방법들은 방사성 물질을 사용해야 하는 문제점이 있으며, 완전 자동화 방법이 아니기 때문에 검사과정에 많은 수고가 수반되어 일반 검사실에서 실제 사용하는 데는 한계를 보였다. 따라서 검사의 효율성이나 속도에는 지장이 없으면서 결핵균 검사실에서 사용하기에 보다 단순하고 자동화된 배양방법에 대한 관심이 많았다. 이러한 방법들은 보다 신속한 결과를 제공하고 검사실 작업을 효율적으로 수행함으로 환자관리를 더욱 강화할 수 있을 뿐만 아니라 전체적으로 보건관리비용도 절감할 수 있을 것으로 기대되었다.

본 연구에서 저자들은 방사성 물질을 사용하지 않는 차세대의 결핵균동정방법 가운데 하나로 Magee 등³²은 CAMLiC(continuous automated mycobacteria liquid culture system)이라고도 부르는 MB/BacT system과 L-J 고체배지의 결핵균 동정에 대한 임상적 유용성을 비교해 보고자 하였다. MB/BacT system은 2001년 1월에 국립마산병원에 도입되어 1년 동안 예비실험을 거쳤으며, 2002년 1월부터 임상결핵연구센터에서 고체배양배지와 함께 사용되고 있다.

결핵균(주로 *M. tuberculosis*) 동정을 위해 여러 임상검체에서 MB/BacT system과 egg medium을 이용한 배양방법을 비교한 여러 편의 연구에서 Garcia 등³³은 분리된 93균주 가운데 MB/BacT system에서는 88(94.6%), egg medium에서는 66(71.0%)개가 자랐으며, 발견까지 평균 배양시간은 각각 16.5와 22.7일로 보고하였다. Magee 등³²은 분리된 191개의 검체에서 MB/BacT system을 이용하여 균발견까지 평균 배양시간은 13.4일로 보고하였다. 또한 Palacios 등³⁴은 도말양성검체에 대해서는 액체 및 고체배지 모두에서 높은 균검출율을 보였으나(L-J 배지 91.8% 대 MB/BacT 95.5), 도말음성검체와 비호흡기 검체에서 MB/BacT system의 균검출율이 훨씬 높았으며, 또한 도말양성 및 음성검체에서 *Mycobacterium tuberculosis*의 평균 발견시간이 L-J 고체배지에서는 각각 16.7일과 26.3일 이었으나, MB/BacT에서는 각각 11.5일과 19.3일로 보고하면서 이상의 결과로 결핵균 검출에 MB/BacT가 L-J고체배지에 비해 훨씬 효율적이고 신속한 방법이며, 새로운 진단법의 개발을 평가하기 위해 수행되는 연구에서는 액체배지와 고체배지를 병용하는 것이 기준검사가 되어야 할 것이라고 제안하였다.

본 연구는 결핵으로 진단된 후 치료중인 99명 환자의 객담검체를 이용하였다. MB/BacT와 L-J 배양법에서 균발견율은 각각 67.6%(67/99)와 52.5%(52/99)였으며, 균성장 발견까지의 평균시간

은 각각 13.3일과 27.2일로 MB/BacT를 이용한 실험을 수행한 다른 보고자³¹⁻³⁶들의 결과와 비슷하거나 다소 짧았다. 또한 도말양성 및 음성검체에서 *Mycobacterium tuberculosis*의 평균 발견시간이 L-J 고체배지에서는 각각 23.5일과 27.6일 이었으며, MB/BacT에서는 각각 11.0일과 13.7일로 도말 음성 검체에 대해서는 Palacios 등³⁴의 결과보다 5.6일정도 짧았다. 15.2%(15/99)의 검체에서 MB/BacT에서만 *Mycobacterium tuberculosis*가 발견되었으며, L-J배지에서만 검출된 경우는 한 건도 없었다. 검사시점에 도말양성인 환자 58명의 객담 검체 중 2개에서 MB/BacT와 L-J배양법 둘 다 음성이었다. 이 중 한 예는 초치료환자의 객담검체로 치료개시 후 L-J배양법에서는 1개월째부터 계속해서 음성이었으며, 3개월째부터는 도말검사상에서도 음성이었다. MB/BacT system으로 검사한 시점은 2개월째이므로 사균일 가능성이 고려되었다. 또 다른 한 예는 재발된 결핵환자의 검체로 검사당시 4개월째 L-J배양법에서 음성이었으나 도말검사상 계속해서 양성을 보였으며, PCR검사상 *M. tuberculosis*로 동정된 경우였다. MB/BacT는 10⁶/ml 이상으로 균이 자랄 때까지는 음성의 결과를 나타낸다. 따라서 균수가 극도로 적거나, 계속해서 사균을 배출할 가능성을 고려해 볼 수 있다. 이러한 결과로 볼 때 임상검체에서 결핵균발견을 위하여 고체배지만 사용하는 일반 검사실에서는 결핵진단이 어려운 환자가 상당히 많을 것으로 생각된다. 국내에서는 임상검체에서 결핵균 발견을 위하여 사용하는 배양배지의 종류 및 검사실의 수에 대한 자료가 없는 실정이며 향후 이에 대한 조사도 필요할 것으로 생각된다.

MB/BacT에서 양성으로 판정된 시간은 radio-metric Bactec과 같은 다른 액체배양법으로 보고된 시간과 비슷한 결과를 보였다. 본 연구에서 MB/BacT 양성인 67검체 중 한 검체에서만 36일이 소요되어 제조사가 제시한 배양기간인 6주정도

배양하면 적절한 결과를 얻기에 충분하다고 판단되었다.

MB/BacT는 14.2%, L-J는 11%의 오염율을 보였으며 주로 그람양성균에 의한 것이었다. 이러한 수치는 동일한 배양방법을 사용하였던 다른 보고와 비슷한 결과였으며, 다른 자동화된 액체배양법을 사용한 보고에 비해서는 다소 높은 결과였다. 하지만 이러한 오염문제는 오염균에 대한 항생제를 첨가함으로써 개선될 수 있을 것으로 기대된다.

MB/BacT system을 사용해 본 경험에 비추어 볼 때, MB/BacT는 검사과정이 자동화되어 기존의 고체배지를 이용한 배양법에 비하여 사용이 상당히 간편하였으며, 폐쇄식(closed system)이어서 검체를 접종한 후 bottles간 교차오염이 이루어지지 않으며, MB/BacT system의 컴퓨터로 자료관리를 전산화할 수 있어서 검사정보를 수시로 공유할 수도 있다. 또한 다른 방사성 방법과 마찬가지로 방사성 물질의 사용이나 폐기 등과 같은 문제도 없었다.

결론적으로 완전 자동화된 MB/BacT system은 L-J배지에 비해 mycobacterium의 검출율이 높고 발견시간이 단축되었다. MB/BacT는 방사성 물질을 사용하지 않는 장점이 있으므로 모든 검사실에 사용하기에 적합할 것으로 보이며, 균동정을 위하여 특이한 DNA probe와 병용하면 CDC가 권고한 결과보고시간에 근접할 수 있을 것으로 생각되었다.

요 약

연구배경 :

완전 자동화된 액체배양법과 기존의 고체배양법을 이용하여 폐결핵환자의 객담내 mycobacterium의 신속검출을 및 양성판정시까지의 시간을 비교하고자 하였다.

방 법 :

2002년 1월 1일부터 2002년 6월 30일 사이에 본원

에 입원 혹은 외래에서 폐결핵으로 치료중인 환자 127명의 객담검체를 이용하였으며, 배양 중 오염된 28개의 검체(MB/BacT system 18개, L-J배지 14개, 4검체는 두 배양법 모두에서 오염)를 제외한 99명의 객담검체를 대상으로 하였다. 검체는 4% NaOH로 전처치한 후 4300rpm으로 20분간 원심분리한 후 멸균된 phosphate buffer(pH 6.8)를 첨가하여 2ml로 만들어 MB/BacT bottle에 0.5ml, Lowenstein-Jensen배지에 0.25ml를 접종한 후 35-37°C에 6-12주간 배양하면서 균검출율과 양성판정시까지의 시간을 비교하였다.

결 과 :

MB/BacT system과 L-J배양법 중 어느 한 방법에서 균성장이 발견된 검체는 67개(67.7%)였다. 두 배양법 모두에서 균성장이 발견된 검체는 52(52.5%)개였으며, MB/BacT에서만 발견된 검체는 15개(15.2%)였으나 L-J배양법에서만 발견된 경우는 없었다. 객담검체의 ZN염색법으로 항산균 집균도말검사상 양성인 검체는 58개, 음성인 검체는 41개였다. 58개의 도말양성 검체 가운데 MB/BacT system에 양성을 보인 검체는 56개(96.6%), L-J배지양성은 46개(79.3%)였으며, 균성장 평균 발견시간은 각각 11.0일과 23.5일이었다. 41개의 도말음성 검체 가운데 MB/BacT system에 양성을 보인 검체는 11개(26.8%), L-J배지양성은 6개(14.6%)였으며, 균성장 평균 발견시간은 각각 13.7일과 27.6일이었다. 전체적으로 MB/BacT system과 L-J배양법에서 균성장 발견시간은 각각 13.3±8.3일, 27.2±0.9일이었다.

결 론 :

완전 자동화된 MB/BacT system은 L-J배지에 비해 mycobacterium의 검출율이 높고 발견시간이 단축되었다. MB/BacT는 방사성 물질을 사용하지 않는 장점이 있으므로 모든 검사실에 사용하기에 적당할 것으로 보이며, 균동정을 위하여 특이한 DNA probe와 병용하면 CDC가 권고한 결과보고

시간에 근접할 수 있을 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Bloom B, Murry CJL. Tuberculosis : commentary on a resurgent killer. Science 1992; 257:1055-64.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Essential components of a tuberculosis prevention and control program. Morbidity and Mortality Weekly Report 1995;44:10-11.
3. World Health Organization. TB, a global emergency: WHO report on the TB epidemic. WHO tuberculosis program information. World Health Organization, Washington, D.C., 1994.
4. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle 1991;72:1-6.
5. American Thoracic Society. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? Am J Resp Crit Care Med 1997;155:804-14.
6. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clinical Microbiology Reviews 1997;10:242-56.
7. Pfaller MA. Application of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. Am J Clin Patho 1994;101:329-37.
8. Pfyffer GE. Amplification techniques: hope or illusion in the direct detection of tuberculosis? Medical Microbiology Letter 1994;3: 335-47.

9. Schluger NW, Ron WN. The polymerase chain reaction in the diagnosis and evaluation of pulmonary infections. *Am J Resp Crit Care Med* 1995;152:11-6.
10. Young K. The detection of mycobacterial DNA using PCR. In: Ehrlich GD, Greenberg SJ(eds). *PCR-based diagnostics in infectious disease*. Blackwell Scientific. London 1994, p. 537-58.
11. Bergmann JS, Woods GL. Clinical evaluation of the Roche AMPLICOR PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:1083-5.
12. Cartuyvels R, De Ridder C, Jonckheere S, Verbist L, Van Eldere J: Prospective clinical evaluation of Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 1996;34:2001-3.
13. D'Amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, Colaninno PM, Scardamaglia M, Ardila E, Ghouri M, Kim K, Patel RC, Miller A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* complex PCR test. *J Clin Microbiol* 1995;33:1832-4.
14. Vannechoutte M, van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* 1995;46:188-94.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1997;46:40-1.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1996;45:950-2.
17. Wolinsky E. Conventional diagnostic method for tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1994;19:396-401.
18. Nolte FS, Metchock B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of clinical microbiology*. Am Society for Microbio. Washington DC 1995, p. 400-37.
19. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993;31:767-70.
20. Bird BR, Denniston MM, Huebner RE, Good RC. Changing practices in mycobacteriology: a follow-up survey of state and territorial public health laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;34:554-9.
21. Styrt BA, Shinnick TM, Ridderhof JC, Crawford JT, Tenover FC. Turnaround times for mycobacterial cultures. *J Clin Microbiol* 1997;35:1041-2.
22. Lipsky BJ, Gates J, Tenover FC, Pordle JJ. Factors affecting the clinical value for acid-fast bacilli. *Reviews of Infectious Disease* 1984;6:214-22.
23. Murray PR, Elmore C, Krogstad DJ. The acid-fast stain : a specific and predictive test for mycobacterial disease. *Annal of Internal Med* 1980;92:512-3.
24. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, Wallace RJ. Laboratory diagnosis of mycobacterioses. In: Weissfeld AS (ed) : *Cumitech 16A*. American Society for Microbiology, Washington

- DC 1994.
25. Kirihara JM, Hillier SL, Coyle MB. Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J Clin Microbiol* 1985;22:841-5.
 26. Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR, Roberts GD. Comparison of a radiometric method(BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:384-8.
 27. Palaci M, Ueki SYM, Sato DN, da Silva Telles MA, Curcio M, Silva EAM. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34:762-4.
 28. Pfyffer GE, Cieslak C, Welscher HM, Kissling P, Rusch-Gerdes S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2229-34.
 29. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, Rusch-Gerdes S. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997;35:364-8.
 30. Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, Gismondo MR, Bono L, Gesu G, Simonetti MT, Volpe G, Nardi G, Marone P. Multicenter comparison of ESP culture system II with BACTEC 460 TB and with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. *J Clin Microbiol* 1998;36:1378-81.
 31. Rohner P, Ninet B, Metral C, Emler S, Auckenthaler R. Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997;35:3127-31.
 32. Magee JG, Freeman R, Barnett A. Enhanced speed and sensitivity in the cultural diagnosis of pulmonary tuberculosis with a continuous automated mycobacterial liquid culture(CAMLiC) system. *J Med Microbiol* 1998;47:547-53.
 33. Garcia FG, Angulo GP, Garcia FG, et al. Evaluation of the MB/BacT automated mycobacteria culture system versus culture on Lowenstein medium. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:339-43.
 34. Palacios JJ, Ferro J, Palma NR. Fully automated liquid culture system compared with Lowenstein-Jensen solid medium for rapid recovery of mycobacteria from clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:265-73.