

등온 증폭법을 이용한 결핵균의 빠른 검출 시스템 개발

안영창 · 남윤형 · 박수민 · 조민호 · 서재원 · 윤일규 · 박용현[†] · 장원철*

단국대학교 첨단과학대학 화학과 및 기초과학연구소

[†]제넷바이오

(2008. 4. 8 접수)

Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay

Young-Chang Ahn, Youn-Hyoung Nam, Su-Min Park, Min-Ho Cho, Jae-Won Seo,
Il-Kyu Yoon, Yong Hyun Park[†], and Won-Cheoul Jang*

Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute,
Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

[†]Chungnam Animal Science Center GenetBio, Konyang Univ, Nonsan 320-711, Korea

(Received April 8, 2008)

요 약. 결핵은 전 세계적으로 심각한 공중보건문제로 남아있다. 최근에는 결핵의 발병률이 증가하고 있는 추세이며 이에 따른 결핵의 정확한 조기치료와 심각한 부작용, 그리고 전염을 방지하기 위해서는 신속하고 정확한 결핵의 진단이 절실하게 필요하다. 본 연구에서는 결핵유전자를 빠르게 검출하는데 있어서 등온증폭법이 가지고 있는 높은 특이성과 신속성에 대하여 평가하였다. 결핵 DNA의 순차적 10배위 정량희석 DNA를 사용하였으며 일반PCR 방법과 등온증폭법의 실험방법의 검출한계, 민감성, 특이성, 재현성을 비교하였다. 그 결과 등온 증폭법은 빠른 증폭 시간과 높은 민감성, 높은 특이성을 가지고 있었으며 병원이나 연구실, 진단 검사실 등에서 결핵유전자를 빠르고 정확하게 진단할 수 있는 유용한 방법이 될 수 있을 것이다.

주제어: 결핵, PCR, 등온증폭법, FIP(Forward Inner Primer), BIP(Back Inner Primer)

ABSTRACT. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) remains a major worldwide public health problem. In recent years, the incidence of MTB has been rising. Rapid and reliable diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* is essential to initiate correct treatment, avoid severe complications, and prevent transmission. LAMP was used to develop a rapid and sensitive laboratory diagnostic system for the MTB. In this research, the loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) that amplifies DNA with high specificity and rapidity at an isothermal condition was evaluated for rapid detection of MTB. Undiluted DNA (2.10×10^6 copy/mL), 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 (copy/mL) of MTB DNA were amplified by PCR and LAMP to determine the sensitivity of the assay. At results, the LAMP assay reported here has the advantages of rapid amplification, high sensitivity, and high specificity and will be useful for rapid and reliable clinical diagnosis of MTB in hospital clinical laboratory.

Keywords: MTB(*Mycobacterium Tuberculosis*), PCR, LAMP(Loop Mediated Isothermal Amplification), FIP(Forward Inner Primer), BIP(Back Inner Primer)

서 론

결핵은 *Mycobacterium tuberculosis* 감염으로 생기는 전염성 질환으로서 감염으로 결절을 만드는 만성 전염성 질환이다. 주로 비말핵의 형태로 호흡기를 통해서 흡입되어 전파된다. 결핵 감염 위험성이 높은 경우는 주로 면역 기능이 약화된 경우인데 영양 결핍, 알콜 중독, 에이즈, 당뇨병, 만성 신부전 등이 있다. 대부분은 처음 감염 시 별다른 증상 없이 자연 치유되고 일부가 휴지기 상태로 오랜 기간 지내다가 개체의 저항력이 감소하여 결핵균 증식에 유리한 상태가 되면 다시 성장하여 발병하게 된다.^{1,2}

인체에서 발생하는 결핵 중 가장 흔한 형태가 폐결핵인데, 이는 예방과 관리 및 화학 요법의 발달로 오늘날 결핵으로 인한 사망은 많이 감소되었으나, 사회경제적으로 낙후된 나라에서는 아직도 결핵에 의한 높은 사망률을 보이고 있다.^{3,4}

결핵의 진단방법으로는 tuberculin 반응, 흉부 X-선 촬영, ROREKA 도말 검사, 면역학적 검사에 의하여 진단한다. 현재 결핵을 진단하는 중합효소 연쇄반응(PCR) 방법에서는 여러 종류의 유전자 부위를 사용하고 있는데 일반적으로 IS6110과 *rpoB* gene, *hsp65* gene 등이 이용되고 있다.^{5,7} 이렇듯 결핵을 진단하는 방법으로 여러 가지가 있지만 방법과 절차가 까다로우며 신속하고 정확한 진단에 어려움이 많다. 게다가 빠르고 신속한 진단을 요구하는 결핵균에 대한 진단은 실제로 많은 시간이 소요되어 어려움이 많은 실정이다. 따라서 임상 진단에서 바로 쓰일 수 있고 기존의 방법보다 빠르고 간편한 결핵 진단 방법이 절실히 요구되고 있어 이와 같은 문제점을 해결해야 할 필요성을 느끼고 기존의 방법보다 빠르고 정확한 등온증폭법으로의 결핵균 검출 방법이 연구되고 있다.^{8,11}

등온증폭법은 2000년 Notomi에 의해 알려진 방법으로 기존의 중합효소 연쇄반응법과 유사하지만 기존의 중합효소 연쇄반응이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하다는 특징이 있다. 별도의 온도 구배를 두지 않고 주형 DNA의 증폭이 가능하게 됨에 따라 PCR 증폭법보다 소요시간을 줄일 수 있으며 무엇보다 고가의 PCR 장비가 아닌 등온 유지가 가능한 항온 수조나 오븐, 온장고 등 저가의 장비에서도

증폭이 가능하며, 장소에 구애 받지 않게 됨에 따라 임상진단 실험실과 현장 및 기타 어느 장소에서도 결핵균에 대한 진단이 가능한 장점을 가지고 있다.^{12,17}

본 연구에서는 결핵의 주요 원인균인 인형 *Mycobacterium tuberculosis* DNA를 등온증폭법을 이용하여 검출하여 이를 기존 PCR법과 비교하여 보고자 한다. 또한 등온증폭법의 검출한계와 재현성, 분석 시간에 대한 실험을 통하여 그 최적조건을 확립하고 결핵균 검출에 등온증폭법을 이용할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

실험 및 방법

시료

본 연구에서는 단국대학교병원의 결핵으로 진단된 환자에서 분리된 인형(*Mycobacterium tuberculosis*) 결핵 균주를 대상으로 하였다.

시약 및 기기

시약

결핵균에서 DNA 추출에는 PrimePrep™ Genomic DNA Isolation Kit(GeNet Bio, Korea)를 사용하였고, 전기영동의 agarose는 QA-Agarose™(Q-bio gene, USA)을 이용하였다.

기기

DNA의 증폭은 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, USA), Chromo 4™ System(Bio-Rad, USA)을 사용하였고, 중합효소 연쇄반응 산물 확인은 Mupid-a(Advance, Japan) 전기영동장치를 이용하였다.

실험 방법

인형(*Mycobacterium tuberculosis*) 결핵 균주에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용하여 *rpoB* 유전자 부위를 증폭을 시킨 후 증폭된 DNA를 전기영동법에 의해 확인하였고 이를 정제하였다. 정제된 증폭산물이 결핵균 DNA가 맞는지 최종적으로 확인하기 위해서 DNA 염기서열분석법을 시행하였다.

결핵균주에서 genomic DNA의 추출

오가와 배지에 배양한 결핵균주에 1 M의 NaOH를 1 mL 넣고 배지 전체에 닿도록 위아래로 섞어준다. 끓는 물에 15분 동안 중탕하여 처리한 용액을 2 mL 원심분리 튜브(tube)로 옮겼다. 1.5 mL 원심분리 튜

브에 proteinase K(20 mg/mL) 20 µL, 전처리 용액 200 µL와 조직분해 완충용액(tissue lysis buffer) 200 µL를 넣고 5 초 동안 섞은 후 항온 수조에서 60°C로 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 튜브에 동량의 PCI-9 (phenol chloroform isoamyl alcohol 25:24:1)를 넣고 5 분간 13,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5 mL 원심분리 튜브로 옮겼다. 상층액에 2 M sodium acetate를 30 µL와 차가운 100% ethanol을 900 µL 넣은 후 가볍게 섞어준다. DNA의 수율을 최대화하기 위해 -20°C에서 30분 동안 두었다. 그 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 한 후 상층액을 버렸다. 70% ethanol을 500 µL 넣고 가볍게 섞어 준 후 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거했다. Ethanol을 완전히 제거하기 위해 오븐에서 1시간 반 동안 건조 시킨 후 50 µL의 용리 완충용액 (elution buffer)을 넣어 줬다. 이렇게 분리한 DNA는 곧바로 실험에 사용하거나 4°C에 보관하고, 장기간 보존하기 위해서는 -20°C에 저장해 두었다.

중합효소연쇄반응(PCR)

Table 1의 PCR primer set를 이용하여 각 시료의 증폭 산물을 얻었다. 각각 25 µL의 반응 용액(Table 2)을 0.2 mL 반응 튜브에 넣은 후, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)을 이용해 DNA를 증

Table 1. Primer sequence sets used to amplify *rpoB* gene for PCR

Sequence of primers Forward (5' → 3'), Reverse (5' → 3')	Size of fragment (bp)
Forward ACT CGA CAT CCT CGA TGG AC Reverse CCA ACA AGA AGG CGT ACT CG	230

Table 2. Condition of working solution for PCR and PCR cycle condition of *rpoB* gene for PCR

Components of PCR	Volume
10X reaction buffer (tris-HCl; pH 9.0, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgCl ₂ , PCR enhancers)	2 µL
10 mM dNTP mix (2.5 mM each)	2.5 µL
Forward primer (10 pmole/µL)	1 µL
Reverse primer (10 pmole/µL)	1 µL
<i>Taq</i> . polymerase (5 U/µL)	0.1 µL
Template DNA (1 ng/µL)	1 µL
Deionized water	17.4 µL
Total	25 µL

Table 3. Condition of PCR cycle

Step	Temp(°C)	Time(sec)	Cycle
Initial denature	94	300	1
Denature	94	30	
Annealing	58	30	33
Extension	72	45	
Last extension	72	210	1

폭(Table 3)시켰다.

Agarose gel 전기영동에 의한 증폭산물의 확인

1.5%(w/v) agarose gel을 이용하여 Mupid-α(Advance, Japan) 전기 영동장치로 PCR 산물을 분석하였다. Agarose 1.5 g을 삼각플라스크(250 mL)에 넣고, 0.5X TBE(tris boric acid EDTA) 완충용액 100 mL을 채운 후에 전자렌지에서 2~3 분 동안 녹인 후 용액을 gel 용기에 부어서 30분 정도 굳혔다. Gel이 완전히 굳은 것을 확인하고 comb을 뽑고 gel을 수거하였다. 수거한 gel을 전기영동장치에 넣고 0.5X TBE 완충용액으로 채운다. 그리고 PCR 산물 4 µL와 6X BPB(bromo phenol blue) dye 0.8 µL를 섞어서 4 µL씩 loading하고 100 V에서 25분 동안 전기영동 하였다. 그 후에 gel을 떼어내어 EtBr(ethidium bromide)로 10 분간 염색하고 다시 10 분간 증류수로 DNA와 결합하지 못한 EtBr을 씻어냈다. 마지막으로 UV transilluminator 위에 agarose gel을 올려놓고 PCR 여부를 확인하였다.

PCR 산물의 정제

1.5 mL 원심 분리 관에 PCR 산물과 PCR 산물의 5 배 양의 결합완충용액을 넣어 혼합한 후 이를 스핀 컬럼으로 조심히 옮긴 후 8,000 rpm에서 30초간 원심 분리하여 여과되어 모아진 용액은 버리고 700 µL 세척완충용액(washing buffer)을 넣고 13,000 rpm에서 30 초간 원심 분리하였다. 여과되어 모아진 용액을 버리고 마지막으로 13,000 rpm에서 2 분간 원심 분리하였다. 그리고 수집 컬럼을 깨끗한 시험관에 옮긴 후 PCR 산물과 동일한 양의 용리완충용액(elution buffer)을 넣고 실온에서 2 분간 반응하고 모아진 용액을 4°C에 보관하였다.

등온증폭반응(LAMP)

Table 4의 등온증폭 반응 primer set를 이용하여 각 시료의 증폭산물을 얻었다. 총 20 µL의 등온증폭 반응용액(Table 5)은 premix 18.5 µL와 DNA 1.5 µL로 구성되었으며 premix는 한번에 제조하여 0.2 mL PCR

Table 4. Primer sequence sets used to amplify *rpoB* gene for LAMP

	Sequence of primers Forward (5' → 3'), Reverse (5' → 3')	Size of fragment (bp)
Forward	ACTCGACACCTCGATGGAC	230
Reverse	CCAACAAGAAGGCGTACTCG	
FIP	GGTTGGATGCCTGCCCTCGGCATACGGATAGGGGATCTCAGT	
BIP	AGCGGTCGGAAGCTCCTATGACAGGGTTTG ATCAGCTCGGTCT	

Table 5. Condition of working solution for LAMP

Components of premix solution	Volume
<i>Bst.</i> 10X reaction buffer (10 mM tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM MgSO ₄ , 10 mM dNTP mix(2.5 mM each))	2 μ L
Forward(10 pmole/ μ L)	0.6 μ L
Reverse primer(10 pmole/ μ L)	0.6 μ L
FIP(10 pmole/ μ L)	1.4 μ L
BIP(10 pmole/ μ L)	1.4 μ L
<i>Bst.</i> polymerase(5 U/ μ L)	1.5 μ L
Deionized water	9 μ L
Total	20 μ L

Table 6. Condition of the LAMP cycle

Condition	Temperature(°C)	Time(min)	Cycle
Initial denature	63		
Denature	63		
Annealing	63	60	
Extension	63		

반응 튜브에 18.5 μ L씩 동량 분주한 후, DNA를 첨가하여 Table 6의 등온 증폭법을 이용해서 DNA를 증폭 (Table 6)시켰다.

DNA 염기서열분석법에 의한 유전자 판별

등온 증폭법에 사용된 primer 중 forward 와 reverse primer만을 이용해 얻은 DNA 증폭산물을 염기서열분석법(ABI 3730x1 DNA analyser, Applied Biosystem, USA)으로 분석하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 비교 후 결핵균임을 확인하였다.

재현성 실험

인형(*Mycobacterium tuberculosis*) 결핵균 DNA(2.1 \times 10⁶ copy/mL)을 일반 PCR방법과 등온증폭법을 이용하여 한번에 6개의 동일 시료를 30번 반복 시행하여 각 실험간 재현성을 테스트 하였다.

민감성 검사

인형 (*Mycobacterium tuberculosis*) 균 DNA 원액 (2.10 \times 10⁶ copy/mL)을 단계희석을 하여 2.10 \times 10⁶~2.10 \times 10⁰ copy/mL의 농도에서 검출 테스트를 하였다.

결과 및 고찰

General PCR에 의한 결핵균 검출

Table 1의 PCR primer set를 이용하여 230bp 증폭 산물을 얻었다(Fig. 2).

등온증폭법에 의한 결핵균 검출

Table 4의 등온증폭 반응 primer set를 이용하여 사다리 형태의 증폭산물을 얻었다(Fig. 3).

Sequencing 결과

General PCR에 사용된 primer와 등온증폭법에 사용된 primer 중 forward 와 reverse만을 사용하여 얻은 증폭산물을 정제하여 sequencing 한 결과 결핵균임을 확인하였다(Fig. 4).

재현성

인형(*Mycobacterium tuberculosis*) 결핵균 DNA(2.1 \times 10⁶ copy/mL)을 일반 PCR방법과 등온증폭법을 이용하여 한번에 6개의 동일 시료를 30번 반복 시행하여 각 실험간 재현성을 테스트 하였다. 실시간 모니터링 시스템은 master mix속에 들어있는 SYBR Green I 이 DNA 이중나선 사이로 결합되어 나타나는 형광을 측정함으로써 Ct와 Tm을 알 수 있고 이를 통해 시료의 농도, 증폭여부 및 종을 확인 할 수 있다. Ct 값은 증폭물이 나타나면서 형광이 증가하기 시작하는 점으로 주형의 농도가 많을수록 빠른 시간 내에 나타난다. Tm 값은 반응이 끝난 후 65~95°C까지 온도를 올려주게 되면 DNA의 이중나선이 단일 가닥으로 떨어지면서 SYBR Green I이 방출되게 되는데 염기서열의 길이 및 구성에 따라 방출되는 온도가 다르다. 이 특정 온도를 이용하여 타겟 DNA가 맞는지 확인할 수 있다. 재현성 테스트 결과 General PCR의 경우 2.1 \times 10⁶~2.1 \times 10³ copy/mL 에서만 증폭을 확인할 수 있었고, 등온증폭법의 경우는 88.3 \pm 0.7°C와 18.5 \pm 0.4 cycle로 나타났다(Table 7, Fig. 5, 6).

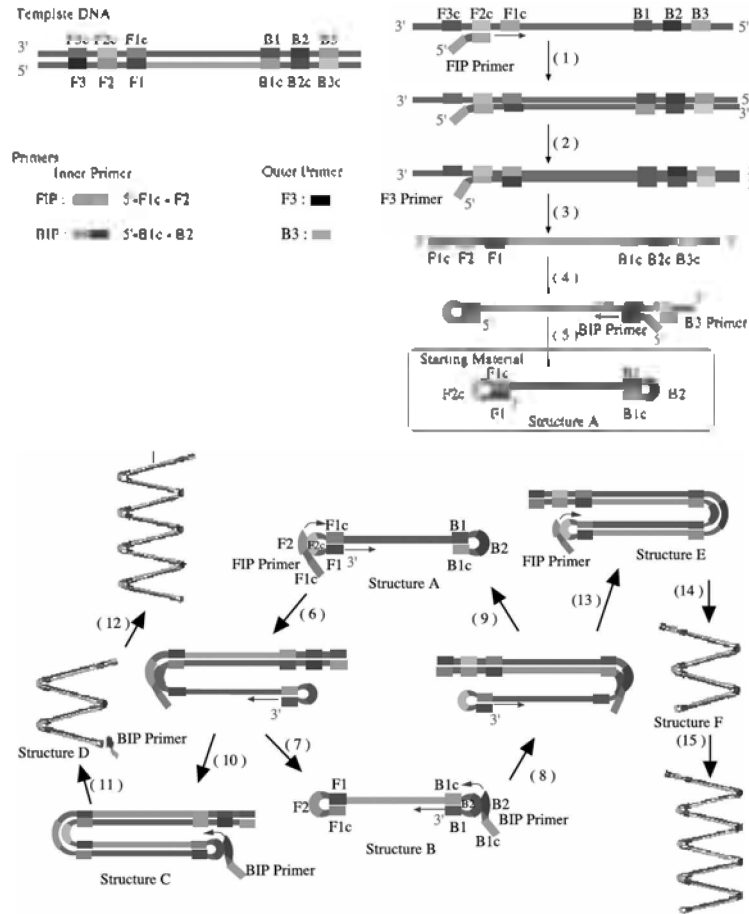


Fig. 1. Schematic representation of LAMP reaction.

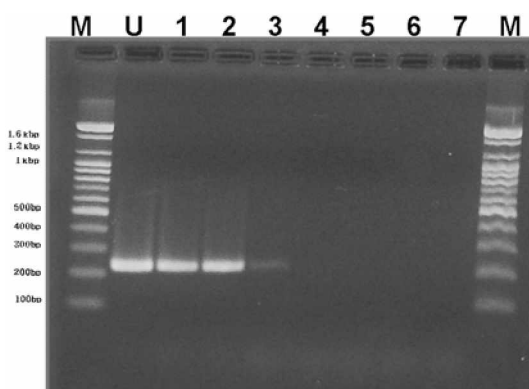


Fig. 2. Detection limit of *rpoB* gene using general-PCR assay. Varying dilutions of the *rpoB* gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^6 were used for the reactions. Lane U-undiluted *rpoB* gene DNA. Lane 1-6 : 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 (copy/ mL) of DNA, Lane 7 : Negative, Lane M: Marker.

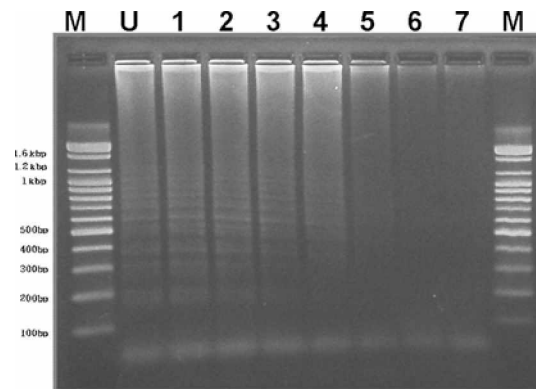


Fig. 3. Detection limit of *rpoB* gene using LAMP assay. Varying dilutions of the *rpoB* gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^6 were used for the reactions. Lane U-undiluted *rpoB* gene DNA. Lane 1-6: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 (copy/ mL) of DNA, Lane 7: Negative, Lane M: Marker.

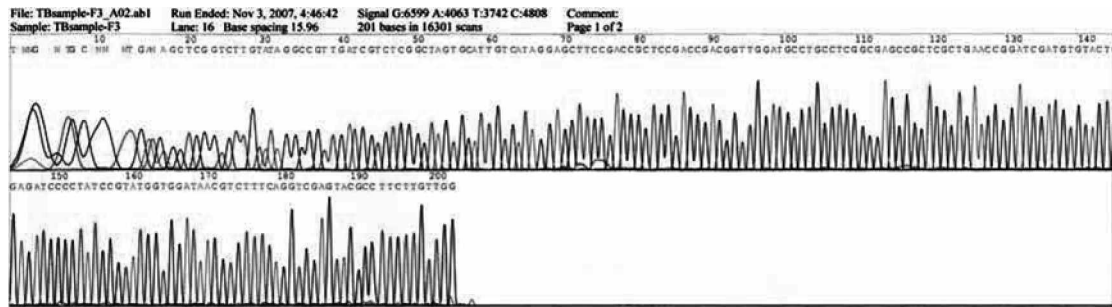


Fig. 4. Sequencing analysis of *rpoB* gene genomic DNA.

Table 7. Comparison of the PCR results conducted on general-PCR assay with LAMP assay

Machine	General-PCR assay	LAMP assay
Test		
Detection range	$2.10 \times 10^6 \sim 2.10 \times 10^7$ copy/mL	$2.10 \times 10^6 \sim 2.10 \times 10^7$ copy/mL
PCR time	90 min	60 min
PCR volume	25 μ L	20 μ L
Ct/deviation	-	18.5 \pm 0.4 cycle
Tm/deviation	-	88.3 \pm 0.7 $^\circ$ C

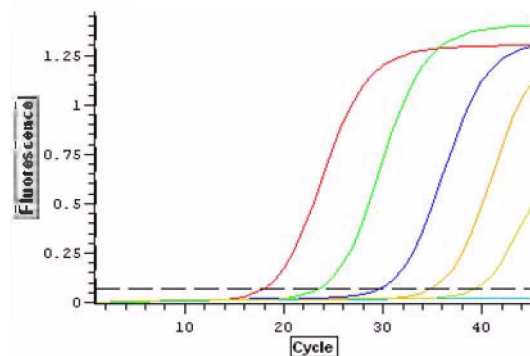


Fig. 7. In situ monitoring of LAMP assays with a broad range of concentration from $2.10 \times 10^6 \sim 2.10 \times 10^0$ copy/mL of *rpoB* gene DNA, from left to right (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , N).

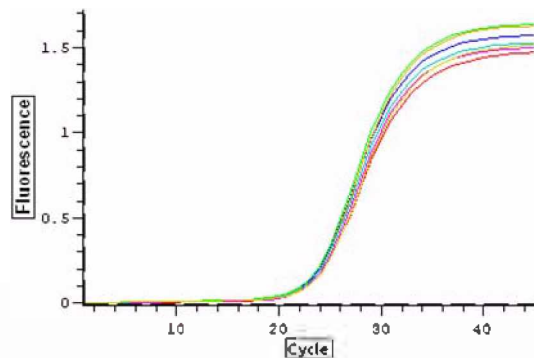


Fig. 5. Isothermal amplification of *rpoB* gene DNA (2.10×10^6 copies/mL).

등온증폭법의 민감성

인형 (*Mycobacterium tuberculosis*) 균 DNA 원액 (2.10×10^6 copy/mL)을 단계희석을 하여 $2.10 \times 10^6 \sim 2.10 \times 10^0$ copy/mL의 농도에서 검출 테스트를 한 결과 등온증폭법에서 농도별 Ct 값의 간격이 3~4 cycle을 유지하며 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 7).

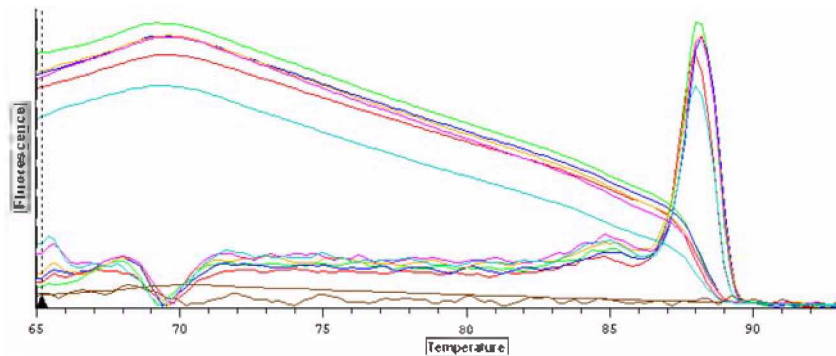


Fig. 6. Melting curve analysis of isothermal amplification.

결 론

등온증폭법은 기존의 중합효소 연쇄반응에서 사용되는 *Taq*. DNA polymerase와는 다르게 *Bst*. DNA polymerase를 사용하므로 가능한 실험방법이다. *Bst*. DNA polymerase는 *Taq*. DNA polymerase와는 달리 5'→3' exonuclease의 성격을 가지고 있어 DNA의 이중나선 구조를 열에 의한 변성을 거치지 않고 Tm 값에 가까운 접합 온도에서 접합 및 신장이 수행된다. 또한 중합효소 연쇄반응에서 사용되는 primer 한 쌍 외에 별도의 primer 한 쌍을 추가 사용하여 타겟 부위에 대한 특이성을 높일 수 있으며 초기 주형 DNA의 양이 적어도 general PCR 보다 더 많은 증폭산물의 증폭이 가능하여 민감도 또한 우수하다(Fig. 1).

장비 또한 특별히 사용되는 것 없이 온도만 유지된다면 general PCR 장비, real-time PCR 장비, 항온 수조, 오븐 등 그 어떤 것도 사용할 수 있다는 장점이 있다. 증폭산물은 general PCR과 유사한 결과를 보이지만 등온증폭법은 절편형태의 사다리 형태로 결과를 나타낸다. 처음 증폭될 때 사용되는 primer는 general PCR과 같은 형태가 사용되지만 따로 사용되는 한 쌍(FIP, BIP)의 primer는 증폭산물의 양 끝을 loop 형태로 만들어 계속된 사다리모양을 만들 수 있다.^{18,22}

단국대학교병원에서 결핵으로 진단된 환자로부터 분리된 인형(*Mycobacterium tuberculosis*) 결핵 균주를 대상으로 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용하여 증폭하고자 하는 부위의 DNA 단편을 real-time PCR을 이용하여 등온증폭방법을 사용하여 증폭하고자 하는 부위의 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭산물을 정제하여 sequencing후 NCBI(National Center for Biotechnology Information)를 이용하여 확인한 결과 인형(*Mycobacterium tuberculosis*)결핵균의 *rpoB* 유전자가 증폭됐음을 확인하였다.

검출 가능한 농도 범위 테스트 결과는 일반 PCR의 경우는 2.10×10³~2.10×10⁶ copy/mL의 범위내에서 검출되었고, 등온증폭법의 경우는 2.10×10²~2.10×10⁶ copy/mL의 범위내에서 검출되어 등온증폭법이 일반 PCR의 경우보다 더 높은 검출 한계를 가지고 있음을 알 수 있었다.

DNA 추출 후 PCR primer set(Table 1) 및 LAMP primer set(Table 2)을 이용하여 유전자를 증폭시킨 후 정제를 거쳐 DNA 염기서열분석법(ABI 3730xl DNA

analyser) 을 통하여 인형(*Mycobacterium tuberculosis*) 결핵균의 *rpoB* DNA를 최종 확인하였다.

그 외에 PCR에 소요되는 시간은 일반 PCR이 90분, 등온증폭방법은 60분이 소요되었다. 그러나 등온증폭법은 한 온도에서 PCR의 기본단계인 변성, 접합, 신장에서 온도의 변화를 두지 않고 한 온도에서 세 단계를 모두 시행함에 따라서 실험소요시간을 단축할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

본 저자는 앞으로 등온증폭법의 검출 한계를 넓혀서 현 결과보다 더 낮은 copy수의 주형 DNA에서도 검출 가능한 조건을 확립할 계획이며 결핵 균 이외에도 살모넬라, 브루셀라, 바실러스 시리우스, 스타필로코커스 등 다양한 병원성 미생물에 적용할 계획이다. 또한 결핵균 진단이 필요한 현장 및 기타 장소에서도 실험을 시행하여 임상 진단 시스템으로 사용할 수 있도록 할 것이며, 진단시간을 획기적으로 단축 시켜 병원성 미생물의 조기 검출의 새로운 대안을 제시하고자 한다.

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술평가단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임

인 용 문 헌

1. Simon A.; Watterson, Stuart M.; *J. Cli. Microbiology.* **1998**, 1969
2. Bodmer, T.; *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, 35, 345.
3. Coban, A.; *J. Antimicrob. Agents.* **2004**, 24, 304.
4. Cohn, D. L.; F. Bustreo; *Clin. Infect. Dis.* **1997**, 24, 121.
5. Dissou Affolabi; Mathieu Odoun; *J. Clin. Microbiol-ogy.* **2007**, 45, 2123.
6. Hiroshi Maeda; Susumu Kokeyuchi.; *Immu. Med. Microbiology.* **2005**, 43, 233.
7. Hong Thi Cam Thai; *J. Clin. Microbiology.* **2004**, 42, 1956.
8. Isik Somuncu Johansen; *J. Molecular Diagnostics.* **2004**, 6, No. 3, Aug.
9. Iwamoto, T.; T. Sonobe; *J. Clin. Microbiology.* **2003**, 41, 2616.
10. Manmohan Parida; *J. Clin. Microbiology.* **2004**, 42, 257.
11. Murphy F. A.; Fauquet C. M.; *Viruses. Arch. Virol.* **1995**, 10, 1.
12. Nagamine K.; *Mol. Cell. Probe* **2002**, 16, 223.
13. Notomi, T.; Okayama, H.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, E63.

14. Ryota Suzuki; *J. Viro. Methods.* **2006**, *132*, 216.
 15. Shinji Fukuda; Shinichi Takao; *J. Clin. Microbiology.* **2006**, *44*, 1376.
 16. Shiro Fukuta.; Shinro Kato.; *J. Viro. Methods.* **2003**, *112*, 35.
 17. Thieny; *J. Clin. Microbiology.* **1990**, *28*, 2668.
 18. Tomotada Iwanoto; Toshiaki Sonobe; *J. Clin. Microbiology.* **2003**, *41*, 2616.
 19. Yasuyoshi Mori; Kentaro Nagamine; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 150.
 20. Yasuyoshi Mori; Masataka Kitao; *J. Biochem. Biophys.* **2004**, *59*, 145.
 21. Yeboah-Manu D.; Yates M. D.; *J. Clin. Microbiology.* **2001**, *39*, 4166.
 22. Yoshikawa; *J. Clin. Microbiology.* **2004**, *42*, 1348.
-