

결핵 환자에서 말초혈액 결핵균 중합효소 연쇄반응 양성 의 임상적 의의

한림대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리학교실*

김규원, 이재명, 강민중, 손지웅, 이승준,
김동규, 이명구, 현인규, 정기석, 이영경*, 이경화*

= Abstract =

Clinical Significance of PCR-Based Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Peripheral Blood

Gyu Won Kim, M.D., Jae Myung Lee, M.D., Min Jong Kang, M.D.,
Jee Woong Son, M.D., Seung Joon Lee, M.D., Dong-Gyu Kim, M.D.,
Myung Goo Lee M.D., In Gyu Hyun, M.D., Ki-Suck Jung, M.D.,
Young Kyung Lee, M.D.*, Kyung Wha Lee, Ph.D.*

Department of Internal Medicine, Clinical Pathology,
College of Medicine, Hallym University, Seoul, Korea*

Background : Since the advent of AIDS, tuberculosis has become a major public health problem in the western society. Therefore, it is essential that pulmonary tuberculosis be rapidly diagnosed. Light microscopic detection of acid-fast organisms in sputum has traditionally been used for rapidly diagnosing tuberculosis. However positive smears are only observed in about one-half to three-quarters of cases. Studies using PCR for diagnosing pulmonary tuberculosis disclosed several shortcomings suggesting an inability to distinguish between active and treated or inactive tuberculosis. In this study, the clinical significance of a PCR-based rapid technique for detecting *Mycobacterium tuberculosis* DNA in peripheral blood was investigated.

Materials and Methods : From July 1, 1998 through to August 30, 1999, 59 patients with presumed tuberculosis, who had no previous history of anti-tuberculosis medication use within one year prior to this study were

Address for correspondence :

Ki-Suck Jung, M.D.

Division of Pulmonary Medicine Hallym University Sacred Heart Hospital

#896 Pyung Chon-Dong, Dongan-Ku, Anyang Kyungki, Republic of Korea 431-070

Phone : 031-380-3717 Fax : 031-380-3973 E-mail : pulmoks@www.hallym.or.kr

recruited and followed up for more than 3 months. AFB stain and culture in the sputum and/or pleural fluids and biopsies when needed were performed. Blood samples from each of the 59 patients were obtained in order to identify *Mycobacterium Tuberculosis* DNA by a PCR test.

Results : 1) Forty five out of 59 patients had a final diagnosis of tuberculosis ; Twenty eight were confirmed as having active pulmonary tuberculosis by culture or biopsy. Four were clinically diagnosed with pulmonary tuberculosis. The other 13 patients were diagnosed as having tuberculous pleurisy (9) and extrapulmonary tuberculosis (4). 2) Fourteen patients showed a positive blood PCR test. The PCR assay correctly identified active tuberculosis in 13 out of 14 patients. The overall sensitivity and specificity of this blood PCR assay for diagnosing tuberculosis were 29% and 93%, respectively. The positive predictive value was 93%, the negative predictive value was 29% and the diagnostic accuracy was 44%. 3) Six out of 14(43%) patients with blood PCR positive tuberculosis were immunologically compromised hosts. 4) A simple chest radiograph in blood PCR positive tuberculosis patients showed variable and inconsistent findings.

Conclusion : A peripheral blood PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* is not recommended as a screening method for diagnosing active tuberculosis. However, it was suggested that the blood PCR assay could contribute to an early diagnostic rate due to its high positive predictive value. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 599-606)

Key words : Blood PCR, *Mycobacterium tuberculosis* DNA.

서 론

항산균 도말검사와 결핵균배양검사는 결핵 진단을 위한 가장 중요한 진단방법이다. 항산균 도말검사는 신속한 결핵진단에 유용한 방법이지만 민감도가 떨어지는 단점이 있다¹. 결핵균배양검사는 민감도와 특이도가 높고 약제감수성검사를 가능하게 하므로 결핵의 진단에 반드시 필요한 검사이지만 배양 조건이 까다롭고 결핵균 배양에 3-8주가 소요되는 단점이 있다². 이러한 문제점으로 인하여 객담 항산균 도말검사 음성이고 배양검사가 양성인 경우 결핵약의 투여가 늦어지는 동안 질환의 악화를 초래할 뿐만 아니라 다른 사람들에게 감염시킬 가능성이 높다. 근래에 들어 서구사회에서는 후천성 면역 결핍증(AIDS) 환자의 증가로 인하여 결핵 발생의 빈도가 이전에 비하여 현저히 증가하였고 이들 환자에서 다제 약제내성 결핵의 발생빈도가 높아서³, 빠르고 정확한 결핵진단을 가능하게 하는 새로운 방법의 도입을 필요로 하게 되었다. 따라서 면역

학적 진단법과 분자생물학적 방법을 이용한 결핵의 진단방법이 새롭게 도입되었다^{4,5}. 이러한 새로운 검사방법 중에서 1985년 Saiki⁶등에 의하여 개발된 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 객담에서 *Mycobacterium tuberculosis* DNA를 검출하는 방법이 기존의 항산균 도말검사 보다 민감도와 특이도가 높아 많이 사용되고 있다⁷⁻¹². 그러나 객담에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 방법은 검사과정에서 발생 할 수 있는 위양성의 가능성과 객담 항산균 도말검사 음성인 경우 활동성과 비활동성 결핵의 감별이 어려운 경우가 실제 임상에서 드물지 않게 발생한다⁴. Schluger¹³등은 결핵 환자의 말초 혈액 세포가 면역학적으로 활성화된다는 Fujiwara¹⁴의 보고를 근거로 결핵 환자에서 결핵균이 말초 혈액으로 들어가 면역학적 활성화에 관련된 세포를 활성화시킬 것이라는 가설 하에 중합효소 연쇄반응을 이용하여 말초 혈액에서 *Mycobacterium tuberculosis* DNA의 검출을 처음으로 보고하였다. 또한 혈액은 채취가

쉽고 검체의 채취 과정에서 오염이 발생할 가능성이 없어서 결핵의 진단에 유용한 방법이 될 것이라고 보고하였다. 말초 혈액 *Mycobacterium tuberculosis* DNA를 검출하여 결핵 진단에 이용하는 경우 결핵 진단율이 보고자마다 다른 결과를 보이고 있으며^{15,16} 이러한 차이가 환자의 면역상태와 관련이 있다는 보고가 있다^{16,17}. 따라서 저자들은 말초혈액 *Mycobacterium tuberculosis* DNA 검출 방법이 결핵의 조기 진단에 유용한 검사인지를 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1998년 7월 1일부터 1999년 8월 30일까지 한림대학교 의료원에 내원한 결핵이 의심되는 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자 중에서 최근 1년 동안 결핵약 복용 병력이 없고 결핵약 투약 후 3개월 이상 경과 관찰이 가능 할 것으로 예상되는 환자만을 포함하였다. 모든 환자에서 결핵 진단을 위하여 임상 검체 항산균 도말검사, 결핵균배양검사 및 필요에 따라 조직검사를 시행하였다. 이들 환자군은 검사 초기에 활동성 결핵, 비활동성 결핵, 결핵이 의심되지만 활동성의 여부가 불확실한 환자군으로 분류가 되었다. 3개월 이상 결핵약 투여 및 경과 관찰 후에 이들 환자군은 활동성과 비활동성 결핵 및 비결핵성 질환으로 최종 분류되었다. 모든 환자에서 결핵약 투약 전에 전혈 13mL를 채취하여 결핵균 PCR 검사를 시행하였다.

2. 방 법

전혈 13mL를 채취한 후 Ficoll-Hypaque density gradient method를 사용하여 단핵구만을 분리한 뒤 DNA를 추출하였으며 이를 결핵균 PCR검사에 사용하였다. 본 연구에서 시행된 결핵균 PCR검사는 *Mycobacterium tuberculosis* complex(*M. tuber-*

culosis, *M. bovis*, *M. africanum*, and *M. microti*)에 특징적으로 존재하는 insertion sequence(IS6110)의 특정부위만을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 TB primer set(바이오니아, 충북)를 이용하였으며, 특이도를 높이기 위해 nested PCR검사를 시행하였다. TB primer set는 IS6110의 특정부위를 증폭시키는 1st PCR primer (5'-CTCAAGGAGCACATCAGC, 5'-TCATAGGAGCTTCCGACC)와 nested PCR을 위한 2nd PCR primer (5'-CTACGGTGTTTACGGTGCCC, 5'-TAGGCGTCGGTGA-CAAAGGC)였다. 10pM의 1st primer set와 2.5U Taq polymerase, 10mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 40mM KCl, 10mM Tris Cl (pH8.3)가 함유된 18 μ l의 pcr tubeon 검체에서 추출한 DNA 2 μ l을 가하여 잘 섞어준 뒤 5분간 원심분리한 후 PNA thermal cycler(Perkin-Elmer 9600™)를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR cycle은 94도에서 1분, 60도에서 1분, 72도에서 1분씩 30 cycle을 시행하였다. nested PCR은 18 μ l의 18-MOP에 1st PCR 반응물 2 μ l을 첨가하여 1st PCR과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 반응이 끝난 2 μ l의 1st PCR 반응물과 2nd primer set를 이동하여 동일한 조건으로 실시하였다. PCR 용액 5 μ l를 1.2% agarose gel에 투여하여 100V로 20분간 전기영동을 시킨 후 양성대조 검체 및 음성대조 검체와 비교하여 결과를 분석하였다.

결 과

1. 대상 환자들의 임상적 특징 및 최종진단

대상환자 59명중 남자 39예, 여자 20예였으며, 평균 연령은 44.7세였다. 활동성 결핵으로 최종 진단된 경우는 45예였고, 이중 28예는 결핵균 배양검사 및 조직검사로 폐결핵으로 확진 되었으며, 항결핵제 투여 전후에 시행한 단순 흉부 방사선소견에서 병변의 호전과 임상적 증상의 호전으로 임상적 폐결핵으로 진단된

Table 1. Final diagnosis of patients

Diagnosis	No. of patients (No.=59)
Active confirmed pulmonary tuberculosis	28
Active clinical diagnosed pulmonary tuberculosis	4
Tuberculosis pleurisy	9
Active extra pulmonary tuberculosis	4
Inactive tuberculosis	13
Non-Small Cell Lung Cancer	1

Table 2. Clinical characteristics of Blood PCR positive patients(n=14)

Radiologic Findings of Blood PCR positive patients (No.=14)	
Cavitary lesions	1
Parenchymal infiltration	6
Destroyed lung	1
Nodular or mass like lesion	3
Non-small cell lung cancer	1
Normal	2
Immune status of Blood PCR positive tuberculosis patients (No.=13)	
Immunocompetent (53.8%)	7
Congestive heart failure	2
Chronic renal Failure	1
HIV (+)	1
DM	2

경우가 4예, 조직검사를 시행하여 병리학적으로 진단된 결핵성 흉막염과 폐외 결핵이 각각 9예와 4예였다. 활동성 결핵이 아닌 14예 중 비활동성 결핵이 13예, 폐암이 1예였다(Table 1.).

2. 말초혈액 결핵 PCR 양성 환자의 면역상태 및 방사선 소견

단순 흉부 방사선 소견에서 공동성 병변 1예, 국한성 폐침윤 6예, 결핵에 의한 폐손상 1예, 종괴 형태의 병변 3예였으며, 2예의 폐외 결핵에서는 정상 흉부 사진 소견을 보였다. 말초혈액 결핵 PCR 양성반응을 나타낸 13명중에서 정상 면역상태를 보인 경우가

7예(54%)였고, 면역상태가 저하된 경우가 각각 심부전 2예, 만성신부전 1예, HIV 양성 1예, 당뇨 2예로 6예(46%)에서 면역상태가 저하되어 있었다(Table 2).

3. 말초혈액 결핵 PCR 양성 환자의 빈도

대상환자 59명 중 말초혈액 결핵 PCR 양성반응을 보인 경우가 14예였고, 이중 13예에서 결핵으로 진단되었다. 결핵으로 진단된 13예는 확진된 폐결핵 7예, 임상적으로 진단된 폐결핵 4예, 조직학적으로 진단된 폐외 결핵 2예였고, 결핵성 늑막염에서는 모두 음성이었다. 나머지 1예는 비소세포 폐암으로 진단되었

Table 3. Blood Tbc PCR positive rate for M. tuberculosis

Final Diagnosis	Blood Tbc PCR	
	Positive(+)(No.=14)	Negative(-)(No.=45)
Active tuberculosis (No.=45)	7	21
Confirmed pulmonary tuberculosis	4	0
Clinically diagnosed pulmonary tuberculosis	2	2
Extra pulmonary tuberculosis	0	9
Tuberculosis pleurisy	1	0
Non-small cell lung cancer	0	13
Inactive tuberculosis		

Sensitivity : 29%, Specificity : 93%, PPV[†]: 93%, NPV[‡]: 29% Accuracy : 44%

PPV[†]: positive predicted value, NPV[‡]: negative predicted value

다. 결핵의 진단에 있어서 말초혈액 결핵 PCR의 민감도는 29%, 특이도 93%, 양성 예측율 93%, 음성 예측율 29%, 정확도 44%였다. 확진된 활동성 폐결핵 환자들 중에서 결핵균 객담도말 음성이고 말초혈액 결핵균 중합효소 연쇄반응 양성인 경우가 5예로 말초혈액 결핵균 중합효소 연쇄반응 검사가 활동성 폐결핵의 조기 진단에 도움이 되었다(Table 3.).

고 찰

신속, 정확한 결핵 진단은 결핵 퇴치를 위한 가장 중요한 요소의 하나이다¹. 그러나 항산균 도말검사는 객담 1ml에 최소한 10⁴개 이상의 결핵균이 존재하여야만 진단이 가능하여 활동성 폐결핵 환자의 50-60%에서만 양성의 소견을 보인다^{18,19}. 또한 배양검사는 시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 이와 같은 결핵균도말 및 배양검사의 한계를 극복하기 위해 PCR검사가 이용되고 있다. 미국 식품의약청은 결핵의 rRNA를 검출하는 GenProbe MTD[®] (Gen-Probe Incorporated, San Diego, CA)와 DNA를 검출하는 AMPLICOR M. tuberculosis test[®] (Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ)를 결핵 진단에 사용 할 수 있도록 승인하였다. 결핵균 PCR 검사는 객담 항산균 도말 검사 양성 및 음성에서 각각

95%와 50%의 민감도를 보이고 특이도는 객담 항상균 도말검사 양성인 유무에 관계없이 95%이상인 것으로 알려져 있다²⁰. 본 교실이 1998년에 보고한 바에 의하면 폐결핵 환자에서 시행한 객담 결핵균 PCR 검사의 민감도는 98.0%, 양성예측도 83.6%, 위양성률 16.4%였다⁷. 본 교실의 또 다른 연구에서는 객담 항산균 도말검사 음성인 환자에서 시행한 기관지 폐포 세척액의 결핵균 PCR 검사의 민감도와 특이도는 각각 40%와 95%였으며 양성 예측도는 89%였다⁸. 임상검체에서 *Mycobacterium tuberculosis*가 배양되거나, nucleic acid amplification test에 의하여 *Mycobacterium tuberculosis*를 증명하거나, 검체를 배양 할 수 없을 때는 임상검체의 항산균 도말검사 양성이면 결핵으로 진단할 수 있다. 하지만 객담 항산균 도말검사 음성이고 객담 결핵균 PCR 검사 양성인 경우와 객담 항산균 도말검사 양성이고 객담 결핵균 PCR 검사 음성인 경우 폐결핵의 진단을 어렵게 한다. 이러한 문제점 이외에 폐결핵 진단에 객담 PCR 검사방법의 사용은 검체의 처리와 수집에 어려움이 있어 폐결핵의 진단에 좀더 쉬운 방법을 필요로 하게 되었다. Fujiwara¹⁴등은 폐결핵 환자의 말초혈액 단핵구가 Interleukin-1(IL-1)의 생성을 증가하고 혈액 T 임파구가 tuberculin purified protein derivative (PPD)에 의하여 자극될 때 정상인 보다 말초혈액 T

입과구 blastogenesis가 억제된다고 보고하여 결핵균에 의한 혈액내 단핵구의 면역학적 활성화를 보고하였다. 이러한 사실에 근거하여 Schluger¹³등은 1994년 결핵균이 혈액 내로 침입하여 면역 활성화와 관련된 세포들을 활성화 할 것이라는 가설 하에 결핵이 의심되는 HIV 양성 환자의 혈액 내 단핵구에서 *Mycobacterium tuberculosis* DNA가 검출된다고 처음으로 보고하였다. Condos¹⁵등은 1996년 시행한 연구에서 결핵진단에 있어서 말초혈액 결핵 PCR의 민감도, 특이도를 각각 95%와 89%로 보고하여 객담 결핵 PCR의 결과와 비슷한 결과를 보고하였다. 이 연구에서 HIV양성 유무와 말초혈액 결핵 PCR의 양성율과는 관련이 없다고 보고하였다. 반면 HIV음성 환자를 대상으로 한 Kolk¹⁶의 보고에서는 11예 중 1예에서만 말초혈액 결핵 PCR검사가 양성으로 보고하여 면역기능 저하와 말초혈액 결핵 PCR검사 양성율과의 관련성을 주장하였다. Aguado²¹등은 말초혈액 결핵 PCR검사가 결핵진단에 사용 될 때 민감도 42%, HIV양성, 음성 환자의 특이도를 각각 33%와 46%로 보고하여 HIV 유무와 말초혈액 결핵 PCR 양성율과의 관련성이 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 민감도 29%, 특이도 93%로 이전의 보고와 비교할 때 특이도는 유사 하나 민감도는 Kolk¹⁶의 보고보다는 높으나 Condos등의 결과보다는 떨어지는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 민감도가 떨어진 이유중의 하나는 PCR 후 hybridizaion assay 방법을 시행하지 않아서 적은 농도로 존재 할 수 있는 *Mycobacterium tuberculosis* DNA를 검출하지 못하였을 가능성이 있다²². 이러한 가능성을 고려하더라도 결핵 환자에서 말초혈액 결핵 PCR검사는 민감도가 낮아 결핵의 선별검사로 사용되기는 적절하지 않다고 생각된다. 그러나 양성예측도는 93%로 높아 PCR이 양성인 경우에는 활동성 결핵의 가능성이 매우 높아 조기진단의 가치가 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 말초혈액 결핵 PCR검사 양성 13예 중에서 면역상태가 저하된 경우가 6예(46%)로 면역 상태와 말초혈액 결핵 PCR검사의 양성율과는 확실한 관계를

규정하기는 어렵다고 생각된다. 따라서 면역상태의 저하와 PCR 양성률의 연관성에 대하여서는 향후 더 많은 연구가 필요 할 것으로 사료된다. 단순 흉부 방사선 소견은 특정한 형태의 방사선소견과 PCR 양성률의 연관성을 밝힐 수가 없었다. 결론적으로 말초혈액 결핵 PCR검사는 특이도는 높으나 민감도가 낮아 결핵진단의 선별 검사로는 유용하지 않는 것으로 사료된다. 그러나 높은 양성 예측율은 결핵의 조기진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

연구 배경 :

기존의 결핵진단 방법외에 신속하고, 정확한 결핵진단법으로 결핵환자의 말초혈액에서 결핵균 PCR검사를 시행하여 검사의 유용성과 말초혈액 결핵 PCR검사 양성인 환자의 면역학적 상태 및 방사선학적 소견을 살펴보았다.

대상 및 방법 :

1998년 7월부터 1999년 8월까지 한림대학교 의료원에 내원하여 결핵이 의심 되었던 환자를 대상으로 하였다. 검체에서 항산균 도말검사 및 결핵균 배양 검사를 시행하였고 진단에 필요한 경우 조직검사를 시행한 환자들 중에서 3개월 이상 경과관찰이 가능하였던 59명의 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자 모두에서 말초혈액 결핵 PCR검사를 시행하였다.

결 과 :

대상환자 59명중 남자 39예, 여자 20예였으며, 평균 연령은 44.7세였다. 45예 에서 결핵으로 최종 진단되었고, 이중 41예는 결핵균 배양검사 및 조직검사로 확진되었고, 4예는 임상적으로 진단되었다. 활동성 폐결핵이 아닌 14예 중 13예는 비활동성 결핵, 1예는 폐암으로 진단되었다. 말초혈액 결핵균 PCR 양성 환자는 14예였으며, 이중 활동성 결핵이 13예, 폐암이 1예였다. 이들 말초혈액 결핵균 PCR 양성인 13예의 결핵 환자의 6예(46%)에서 면역상태의 저하를 보였다. 결핵의 진단에 있어서 말초혈액 결핵균 PCR

검사의 민감도 29%, 특이도 93%, 양성 예측도 와 음성 예측도가 각각 93%, 29%였다.

결론:

말초혈액 결핵균 중합효소 연쇄반응 검사는 특이도가 높은 반면 민감도는 낮아 결핵 선별 검사로는 유용하지 않을 것으로 보인다. 그러나 양성예측도가 높아 검사가 양성인 경우 활동성 결핵의 조기 진단에 도움을 줄 것으로 사료된다.

참고문헌

1. American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-95.
2. Doern GV. Diagnostic mycobacteriology : Where are we today?. *J Clin Microbiol* 1996;34:1873.
3. Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991;324: 1644-50.
4. American Thoracic Society. Rapid diagnostic tests for tuberculosis : what is the appropriate use? American Thoracic Society Workshop. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1804-14.
5. Anargyros P, Astill DSJ. Comparison of improved BATEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990;289:1288-91.
6. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
7. 경태영, 이준호, 채경수, 김동규, 모은경, 박명재, 이명구, 현인규, 남기형, 이경화, 정기석. 폐결핵에서 객담 결핵균 중합효소 연쇄반응검사의 누적 양성율. *대한내과학회지* 1998;55:1049-56.
8. 모은경, 경태영, 김동규, 박명재, 이명구, 현인규, 정기석, 이경화. 객담 도말 음성인 환자에서 기관지폐포 세척액 결핵균 중합효소 연쇄반응 검사의 유용성. *결핵 및 호흡기 질환* 1998;45:519-28.
9. 김호중, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철. Polymerase chain reaction을 이용한 결핵의 진단에 관한 연구. *결핵 및 호흡기 질환* 1992;39:525-32.
10. Bradley SP, Reed SL, Catanzaro A. Clinical efficacy of the amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153: 1606.
11. Dilworth JP, Goyal M, Young DB, Shaw RJ. Comparison of polymerase chain reaction for IS6110 and Amplicor in the diagnosis of tuberculosis. *Thorax* 1996;51:320.
12. Dalovisio JR, Montenegro-James S, Kemmerly SA et al. Comparison of the amplified Mycobacterium tuberculosis (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. *Clin Infect Dis* 1996;23:1099-106.
13. Schluger NW, Condos R, Lewis S, Rom WN. Amplification of DNA of Mycobacterium tuberculosis from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1994;344:232-3.
14. Fujiwara H, Kleinhenz ME, Wallis RS, Ellner JJ. Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:73-7.
15. Condos R, McClune A, Rom WN, Schluger NW. Peripheral-blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1996;347:1082-5.
16. Kolk AH, Kox LF, Kuijper S, Richter C. Detec-

- tion of *Mycobacterium tuberculosis* in peripheral blood. *Lancet* 1994;344:694.
17. 22. Niyaz A, Ashok KM, Utpal M, Virender KB, Sunita G. PCR-Based Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in blood from Immunocompetent patients with Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiology* 1998;36:3094-5.
18. Krasnow I, Wayne LG. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. *Appl Microbiol*. 1969;18:915-7.
19. Shinnick TM, Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin Infect Dis*1995;21: 291-9.
20. Catanzaro A, Perry S, Clarridge JE, Dunbar S, Goodnight-White S, LoBue PA et al. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis : results of a multicenter prospective trial. *JAMA* 2000;283:639-45.
21. Aguado JM, Rebollo MJ, Palenque E, Folgueria L. . Blood-based PCR assay to detect pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1996;347:1836-7.
22. Raffaele DP, Adriana M, Marina D, Roberto S, Vito P, Giuseppe M. Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA in blood of patients with acute pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction and non-isotopic hybridisation assay. *J Med Microbiol* 1997;46:495-500