Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE **ORIGINAL ARTICLE****Evaluation of the Effectiveness of a Re-decontaminating Process with Bacterial Contaminated Specimens Showing a Positive MGIT Signal for the Detection of Mycobacteria**

Haeyong Jung, Hae In Bang, Tae Youn Choi

Department of Laboratory Medicine, Soonchunhyang University Seoul Hospital, Seoul, Korea

마이코박테리아 검출을 위하여 MGIT 양성 신호를 보인 세균에 오염된 검체 재처리 과정의 효율성 평가

정해용, 방해인, 최태윤

순천향대학교 서울병원 진단검사의학과

ARTICLE INFO

Received February 18, 2019

Revised March 25, 2019

Accepted April 2, 2019

Key wordsBACTEC MGIT 960 system
Mycobacterium tuberculosis
Nontuberculous mycobacteria
Ogawa media**ABSTRACT**

A comparative study between commercially available mycobacteria growth indicator tubes (MGIT) in the BACTEC MGIT 960 System and the conventional Ogawa media was carried out to assess the effectiveness of the re-decontaminating process for the recovery of mycobacteria. Processed specimens with 5% sodium hydroxide and 0.5% N-acetyl-L-cysteine were inoculated into MGIT and Ogawa media. The acid fast bacilli (AFB) recovered from the cultures were identified using a mycobacterium tuberculosis (TB) antigen kit. If contaminants were observed in the MGIT tubes within five days, a decontaminating process was repeated. A total of 1,190 out of 4,790 (24.8%) specimens showed positive results using the BACTEC MGIT 960 system. Among them, 278 specimens were reprocessed. When the MGIT and Ogawa results were compared, it showed discordant results (weighted kappa value: 0.283). One TB and 10 nontuberculous mycobacteria (NTM) were newly detected in MGIT only. The likely benefit of the re-decontaminating process is the detection of additional mycobacteria that could not be detected without a re-decontaminating process despite being small in number. In addition to the combination of MGIT and Ogawa, the re-decontaminating process is recommended in the case of contaminations to recover mycobacteria.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

결핵은 전염력, 이환율과 사망률이 높아서 과거로부터 현재까지 인류의 생명을 앗아간 심각한 감염 질환으로 선진국과 후진국을 막론하고 전세계적으로 발생하고 있다[1]. 우리나라는

1965년부터 1995년까지 5년 간격으로 결핵실태조사를 실시하여 유병률, 감염률, 감염 위험률을 파악하고 2000년부터는 결핵정보감시체계를 구축하여 운영하고 있다. 또 결핵을 관리하기 위한 노력으로 영아를 대상으로 Bacille Calmette-Guérin (BCG) 예방접종을 시행하고 최근에는 모든 의료 종사자를 대상으로 잠복결핵 검사 및 치료를 실시하고 있다. 활동성 결핵 유병률은 1965년 인구 10만 명당 5,168명에 달했던 것이 1995년 인구 10만명당 767명으로 감소하였고 2011년도부터 정부의 결핵 관리 정책이 강화됨에 따라 2011년부터 2016년도

* Corresponding author: Hae In Bang

Department of Laboratory Medicine, Soonchunhyang University Seoul Hospital, 59

Daesakwan-ro, Yongsan-gu, Seoul 04401, Korea

E-mail: genuine43@schmc.ac.kr

* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7854-3011>

에 이르기까지 결핵 발생률이 매년 5.2%씩 감소하였다[2]. 이처럼 결핵을 관리하기 위한 적극적인 노력으로 어느 정도 성과는 거두었지만 결핵 퇴치까지는 아직 못 미치는 실정이다. 특히 2014년 기준으로 OECD 회원국과 우리나라의 결핵의 유병률, 발병률, 사망률은 비교했을 때 인구 10만명당 각각 101.0명, 86.0명, 3.8명으로 OECD 회원국 중 가장 많은 수를 보이고 있다[3].

결핵 퇴치가 어려운 이유는 여러 가지가 있는데 그 중 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*, TB)의 특성으로 그 무게가 가벼워 공기를 통해 전파되고[4] 세포벽 지질성분이 백혈구의 탐식 작용을 방해하여 치료가 어려운 특징이 있다[5]. 뿐만 아니라 일반 세균에 비해 배양 속도가 늦어 결핵 진단에 일정 시일이 걸리는 등의 어려움이 있다[6]. 이러한 이유로 결핵균을 배양하기 위하여 Ogawa media (오가와 배지, 고체배지)에 추가로 Ogawa media보다 빠르게 결핵균을 배양할 수 있는 액체배지를 사용하고 있다. 원내에서는 액체배지 배양 방법으로 BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)을 동시에 시행하고 있다[7]. BACTEC MGIT 960 system은 배양 용기에 Middlebrook 7H9 성분과 배양 촉진 물질인 oleic acid, albumin, dextrose와 catalase가 포함되어 있고 잡균억제를 위해 항생제(polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim, azlocillin)가 포함되어 있는 Mycobacterium growth indicator tube (MGIT)를 장비에 장착하면 60분에 한번씩 배양 여부를 감시하여 좀더 빠른 배양 양성 감시가 가능한 장점이 있다[8]. 반면 BACTEC MGIT 960 system은 항생제 내성을 가진 일반세균의 증가와 진균에 의한 오염율이 높은 단점이 있다. 이러한 단점을 개선하기 위해서 오염된 검체는 전처리를 한번 더 반복하여 배양함으로써 오염을 제거하게 되는데[8] 이 과정에 시간이 소요되고 비용이 드는데 반하여 그 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 연구에서는 오염된 검체를 재처리 했을 때의 MGIT의 배양 결과를 살펴보고 Ogawa media에 배양한 결과를 비교하여 재처리의 효용성에 대하여 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 연구대상

검사 대상은 2016년 1월부터 12월까지 1년간 한 대학병원에서 결핵배양 검사 의뢰 검체(객담, 소변, 뇌척수액, 늑막액)를 대상으로 실시한 환자 중 BACTEC MGIT 960 system에 의해 MGIT에서 균이 배양된 검체를 대상으로 후향적 조사를 하였다.

2. 전처리 용액 조제

1) 5% NaOH 용액은 증류수(distilled water, DW) (JW pharmaceutical, Seoul, Korea) 500 mL을 실험용 용기 2개를 준비하여 하나는 sodium hydroxide (NaOH) (Wako pure chemicals, Osaka, Japan) 25 g을 녹였고, 나머지 하나는 sodium citrate tribasic dehydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Duksan pure chemicals, Ansan, Korea) 12.5 g을 실온에서 녹였다. 이 2개의 병을 섞어서 잘 혼합한 후 15기압 121°C에서 15분간 고압증기멸균기(Hansung Medical, Cheonan, Korea)로 멸균하였다.

2) 인산화완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)는 DW (JW pharmaceutical) 500 mL를 실험용 병을 2개를 준비하여 sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4) (Duksan pure chemicals, Ansan, Korea)를 4.74 g을 녹였고, potassium phosphate (KH_2PO_4) (Duksan pure chemicals)를 4.54 g을 실온에서 녹였다. 이 2개의 병을 섞어서 잘 혼합한 후 15기압 121°C에서 15분간 고압증기멸균기로 멸균하였다.

3. 전처리

5% sodium hydroxide (NaOH) 용액은 0.5% NALC (N-acetyl-L-cysteine) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)를 첨가하고 혼합물을 진탕한 후 30분간 실온에 방치 후에 사용하였다. 의뢰된 검체 약 7.5 mL를 원추형 시험관(Neurex, Bucheon, Korea)에 넣고 총 15 mL가 되도록 동량의 5% sodium hydroxide (NaOH)을 첨가하였다. 검체와 NaOH 용액 혼합물을 15분간 실온에 방치하고 5분에 한번씩 충분히 소용돌이 혼합(vortex mix)을 시행하여 검체를 잡균제거 및 균질화 하였다. 이 후 DW를 35 mL를 첨가한 후 4°C 냉장 상태, 3,000 G에서 20분간 원심분리 하였다. 분리 후 상층액은 조심스럽게 버리고 남은 침전물에 1 mL의 PBS를 첨가하여 혼합시킨 용액을 배양에 사용하였다.

4. MGIT 배양

전처리 및 집균한 검체를 액체배지인 MGIT (Becton Dickinson)에 500 μ L를 첨가하여 접종하였다. MGIT에 검사 전 마이코박테리아를 잘 배양하기 위한 영양성분(bovine albumin, catalase, dextrose, oleic acid, polyoxyethylene stearate)과 기타 미생물을 억제하기 위한 항생제(polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim, azlocillin)가 주 성분인 PANTA (Becton Dickinson)를 800 μ L씩 분주하

였다. MGIT는 BACTEC MGIT 960 system에 장착하였으며 이는 세균의 성장으로 산소를 소비함에 따라 활성 되는 형광을 측정하는 방법으로 균의 배양 유무를 측정하였다.

5. Ogawa media 배양

전처리 및 집균한 검체를 300 µL를 Ogawa media (The Korea institute of Tuberculosis, Seoul, Korea)에 접종하여 37°C에서 8주간 배양하여 배지에 성장 유무를 육안 관찰하였다.

6. 배양 양성검체 처리

MGIT 또는 Ogawa media에서 배양된 균은 배양된 집락으로 슬라이드를 제작하여 Ziehl-Neelson 마이코박테리아 염색으로 확인하였다. Ziehl-Neelsen 염색의 과정은 다음과 같다. 먼저 carbolfuchsin (YD-diagnostics, Yongin, Korea)을 슬라이드에 충분히 분주한 후 알코올램프를 이용하여 시약에 김이 날 정도로 2~3초간 가열하고 5분간 방치한다. 이후 970 mL absolute alcohol (Duksan pure chemicals)에 30 mL hydrochloric acid (HCL) (Duksan pure chemicals) 혼합한

3% Acid alcohol을 분주하고 1분간 반응시키고 마지막으로 5분간 methylene blue (YD-diagnostics)로 배경 염색하였다. 이를 현미경으로 검정하여 붉은색 간균이면 마이코박테리아로 판독하고, MPT 64 TB Ag kit (Standard diagnostics)로 검사한 결과 양성이면 결핵균으로 음성이면 비결핵 마이코박테리아 (non-tuberculosis mycobacterium, NTM)으로 판독하였다. 반면 Ziehl-Neelson 염색에서 붉은 색 간균 이외의 세균이 검정 되는 경우 오염으로 판단하였다. 특히 MGIT에서 접종 5일이내 오염으로 판단된 배지는 재처리 하였다. 재처리 방법은 MGIT 내 검체가 접종된 배양액을 검체와 같이 취급하여 집균 제거, 균질화, 농축을 실시하여 새로 준비한 MGIT에 접종하였다.

7. 데이터 처리 및 통계분석

검사는 2016년 본원에 BACTEC MGIT 960 System에 의해 보고된 결과를 정리하였으며, 재처리한 MGIT와 Ogawa media의 결과를 비교하기 위해서 엑셀(Microsoft, Washington, US)을 이용하여 weighted Conhen's kappa value를 계산하였다.

결 과

1. 재처리 전 · 후의 MGIT 배양 결과

2016년에 시행한 MGIT배양 결핵 검사는 전체 4,790건이었다(Figure 1). 6주간 배양하였을 때 전체 검체 중 배양 음성(No growth) 검체는 3,600건(75.2%)이었고 배양 양성 검체는 1190건(24.8%)이었다. 배양 양성 검체 중 결핵균(TB) 배양은 251건(5.2%), NTM 배양은 307건(6.4%)이었으며 위양성은 632건(13.2%)이었다. 위양성 중 아무것도 자라지 않은 것은 40건(0.8%)이었고 오염균이 배양된 것은 592건(12.4%)이었다.

Figure 1. Schematic diagram of the study population and sample sizes. Number in bracket represents number and proportion of samples included or excluded from the study. Abbreviations: MGIT, Mycobacteria growth indicating tube; AFB, Acid-fast bacilli; NTM, Nontuberculosis mycobacteria; TB, Tuberculosis mycobacteria.

Figure 2. The difference results of before and after re-decontaminating processing. Abbreviations: NTM, Nontuberculosis mycobacteria; TB, *Tuberculosis mycobacteria*.

오염균으로 인한 위양성 검체 중 접종 후 5일 이후에 배양된 것은 314건(6.6%), 5일 이내 배양된 것은 278건(5.8%)이었고 이를 대상으로 재처리를 시행하였다. 재처리를 시행한 278건의 배양 결과 배양 음성은 259건(93.2%), 결핵균 배양은 4건(1.4%), NTM 배양은 15건(5.4%)이었다. 재처리한 결과를 토대로 검체 배양결과를 재구성하면 배양 음성 검체는 3,890건(80.6%)였고 배양 양성 검체는 931건(19.4%)이었다. 배양 양성 검체 중 결핵균 배양은 255건(5.3%), NTM 배양은 322건(6.7%), 위양성은 354건(7.4%)로 나타났다(Figure 2).

2. 재처리한 MGIT와 Ogawa media 배양 결과 비교

재처리한 검체 278건을 Ogawa media에 배양한 결과와 비교하였다(Table 1). 재처리한 MGIT와 Ogawa media의 결과를 비교했을 때 246건(89.7%)이 일치하는 결과를 보였다. 재처리한 MGIT와 Ogawa media 모두에서 238건(85.6%)이 배양 음성 결과를 보였고, 결핵균 배양은 3건(1.1%), 또 NTM 배양은 5건(1.8%)이었다. 반면 재처리한 MGIT와 Ogawa media의 결과를 비교했을 때 32건(11.5%)이 일치하지 않는 결과를 보였다. 재처리한 MGIT는 결핵균 배양, Ogawa media는 배양 음성 결과는 1건(0.4%), 재처리한 MGIT는 결핵균 배양, Ogawa media는 NTM 배양의 결과는 0건(0.0%), 재처리한 MGIT는 NTM 배양, Ogawa media는 배양 음성의 결과는 10건(3.6%)였고 재처리한 MGIT는 NTM 배양, Ogawa media는 결핵균 배양의 결과는 0건(0.0%), 재처리한 MGIT는 배양 음성, Ogawa media는 결핵균 배양의 결과는 2건(0.7%), 재처리한 MGIT는 배양 음성, Ogawa media는 NTM 배양의 결과는 19건(6.8%)였다.

3. 데이터 처리 및 통계분석

재처리한 MGIT와 Ogawa media의 배양 결과를 비교한 결과 weighted kappa value는 0.283로 0.7이하로 재처리한

MGIT와 Ogawa media의 균 동정 결과가 일치하지 않는 것으로 나타났다.

고 찰

결핵 진단을 위한 검사는 투베르쿨린 피부반응 검사, 체외 인터페론 감마 검사, 흉부방사선 촬영 등 여러 가지 진단방법이 사용되고 있으나 결핵균 배양 검사는 결핵균을 검출할 수 있는 가장 확실한 방법이다[9]. 하지만 결핵균 검출을 위한 배양은 시간이 오래 걸린다는 단점이 있어 이를 보완하기 위하여 액체배지 배양방법인 BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson)을 이용한 배양 방법을 시행하여 기존 Ogawa media만 사용하였을 때보다 배양시간을 단축할 수 있게 되었다[10]. 하지만 MGIT의 단점은 오염율이 높아 오염을 줄이기 위한 대표적인 방법으로 sodium hydroxide (NaOH) 용액의 농도를 높이거나 PANTA에 MGIT growth supplement (enrichment)액을 보통 15 mL 첨가하는 것을 10 mL을 첨가하여 PANTA의 농도를 높이는 방법이 있다. 하지만 이러한 노력에도 불구하고 오염이 발생하면 오염 배지의 재처리를 통해 오염을 제거하고 재배양하여 마이코박테리아를 배양하는 방법을 사용하고 있다[8]. 본 연구에서 오염 재처리 과정을 시행한 MGIT 결과는 결핵균 배양이 4건(1.4%), NTM 배양이 15건(5.4%), 배양 음성이 259건(93.2%)이었고 해당 재처리한 검체의 Ogawa media 접종 결과는 결핵균 배양이 5건(1.8%), NTM 배양이 24건(8.6%), 배양 음성이 249건(89.6%)이었다. 이는 기존 연구에서 Ogawa media보다 MGIT의 배양 양성률이 높은 것과는 대조되는 결과를 나타낸 것으로 오염제거 과정을 두 번 시행함으로써 오염균 뿐 아니라 마이코박테리아의 배양 역시 영향을 받을 수 있다고 사료된다. 하지만 MGIT의 장점인 빠른 배양은 오염 판단 및 재처리하는데 시간이 소요됨에도 불구하고 MGIT (20.5일)가 Ogawa media (36.5일)보다 평균 16일 빠른 결과를 보였다. 때문에 오

Table 1. Comparing contamination reprocessed MGIT tubes with Ogawa media

		No. (%) of culture results for			
		MGIT culture results*			
		NG	NTM	TB	Total
Ogawa culture results	NG	238 (85.6)	10 (3.6)	1 (0.4)	249 (89.6)
	NTM	19 (6.8)	5 (1.8)	0 (0.0)	24 (8.6)
	TB	2 (0.7)	0 (0.0)	3 (1.1)	5 (1.8)
	Total	259 (93.2)	15 (5.4)	4 (1.4)	278 (100)

Abbreviations: NG, No growth; NTM, Nontuberculosis mycobacteria; TB, *Tuberculosis mycobacteria*.

*After re-decontaminating process.

염 배지를 재처리 하면 배양 양성율은 Ogawa media보다 떨어지지만 결과의 신속성은 Ogawa media보다 효율적인 것을 알 수 있었다. 더불어 재처리한 MGIT와 Ogawa media의 결과 일치율을 비교해 보았을 때 weighted kappa value는 0.283로 통계적으로 일치하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 재처리한 MGIT 278건 중 불일치 건수는 32건(11.5%)을 자세히 살펴보면 결핵균 배양은 총 6건(2.3%) 중 3건(1.2%)은 재처리한 MGIT와 Ogawa media에서 모두 배양 양성 결과를 보였고 1건(0.4%)은 재처리한 MGIT에서 나머지 2건(0.7%)은 Ogawa media만 배양 양성 결과를 나타냈다. 또한 NTM 배양은 총 34건(12.4%) 중 5건(2.0%)은 재처리한 MGIT와 Ogawa media 모두에서 배양 양성 결과를 보였고 10건(3.6%)은 재처리한 MGIT, 19건(6.8%)은 Ogawa media에서 배양 양성을 나타냈다(Table 1). 이러한 결과는 이전 연구에서 MGIT 배양 후, 오염이 되었던 170건을 재처리하여 MGIT에 재배양해도 마이코박테리아를 한 건도 검출할 수 없어서 재처리 과정이 효과적이지 않았다고 보고한 바가 있으나[11] 본 연구에서는 오염된 MGIT를 재처리 및 재접종 함으로써 결핵균 1건, NTM 10건의 경우는 Ogawa media의 위음성 결과를 보완해주는 역할을 수행하는 것을 확인할 수 있었고 이에 오염된 MGIT의 재처리 및 재접종 과정이 필요하다 생각된다.

특히 결핵균 배양보다 NTM 배양의 경우 재처리 시행 후 추가 검출되는 건수가 많았는데 NTM는 결핵균과 나병균(*Mycobacterium leprae*)을 제외한 것으로 약 170여 종이 알려져 있으며[12] 과거에는 우리 주변 환경에서 흔히 존재하는 오염균으로 간주되어 왔지만 면역저하 환자나 노인 인구 증가에 따른 연령이 높은 환자에게 폐질환을 일으키는 빈도가 높아짐으로써 많은 관심을 모으고 있다[13, 14]. 우리나라의 경우 일본과 미국에 비해 높은 NTM으로 인한 폐질환 감염률을 보이기 때문에 최대한 검출하고자 하는 노력을 기울여야 할 것이다[15]. 동정되는 균 또한 우리나라는 *M. avium*과 *M. intracellulare*의 비율이 높은 반면 미국은 *M. chimaera*가 높은 비율을 차지하는 등의 지역에 따라 차이가 있다[15]. 이렇듯 NTM 감염증은 연령이 높아짐에 따라 발생빈도가 증가하고 지역에 따라 원인 균종이 다를 뿐만 아니라 한 환자에서도 자주 변화할 수 있기에 균 동정 검사를 시행하는 것이 필요하다[16]. 하지만 본 병원에서 NTM 배양 균주로 NTM 동정검사를 시행하는 건수는 322건 중 155건(48.1%)으로 최대한 NTM을 배양 검출하는 것도 중요하겠지만 추가로 NTM 배양 균주의 동정검사 및 약제 내성 검사를 실시하는 것도 필요하다 생각된다.

본 연구는 2016년 한 대학병원에서 마이코박테리아 배양검

사 결과를 토대로 오염된 MGIT의 재처리에 대한 효율성을 살펴보고자 재처리한 MGIT의 배양결과와 같은 검체로 시행한 Ogawa media의 배양 결과를 비교하였다. 그 결과 재처리한 MGIT는 배양 성공률이 떨어지는 경향을 보였지만 재처리를 하는 시간이 더 소요되었음에도 불구하고 검사 결과가 나올 때까지 소요되는 시간은 Ogawa media보다 짧은 것을 알 수 있었다. 또한 재처리한 MGIT와 Ogawa media는 특히 NTM 배양에서 상호 보완적으로 폐질환 환자의 진단에 기여한다고 생각되며 보다 적극적인 진단을 위하여 배양된 NTM을 동정까지 실시하는 것이 필요하다 사료된다.

요 약

BACTEC MGIT 960 system의 mycobacteria growth indicator tube (MGIT) 오염 제거과정의 효율성을 평가하기 위하여 기존 3% Ogawa media와 마이코박테리아의 배양 양상을 비교하였다. 검체는 5% sodium hydroxide (NaOH)과 0.5% N-acetyl-L-cysteine (NALC)를 처리하여 MGIT와 Ogawa media에 접종하였다. 배양된 마이코박테리아는 결핵균(*mycobacterium tuberculosis*, TB) 항원 kit로 동정하였다. 만약 MGIT에서 5일 이내에 오염균 배양되면 오염제거 과정을 반복하였다. BACTEC MGIT 960 system에 장착한 MGIT 4,790건 중 1,190건(24.8%)이 배양 양성의 결과를 보였고 이중 278건을 재처리 하였다. MGIT와 Ogawa media 사이의 결과를 비교하였을 때 불일치 결과(weighted kappa value: 0.283)를 보였고, 특히 TB 1건과 nontuberculous mycobacteria (NTM) 10건이 재처리한 MGIT에서만 배양되었다. 비록 소수이지만 재처리 과정으로 검출할 수 없었던 마이코박테리아를 검출하였다. 이는 마이코박테리아 검출을 위하여 MGIT와 Ogawa media를 동시에 시행할 뿐 아니라 MGIT에서 위양성을 보이는 경우, 검체의 재처리 과정을 추가하는 것이 필요하다 생각된다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Jung H, M.T.; Bang HI, M.D.; Choi TY, M.D.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.

2. Go UY, Park MS, Kim UN, Lee SD, Han SM, Lee JY, et al. Tuberculosis prevention and care in Korea: evolution of policy and practice. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2018;11:28-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jctube.2018.04.006>.
3. Korean National Tuberculosis Association. Domestic tuberculosis status [Internet]. Seoul: Korean National Tuberculosis Association; 2018 [cited 2018 November 1]. Available from: <https://www.knta.or.kr/tbInfo/tbCondition/tbCondition.asp>.
4. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu rev biochem*. 1995;64:29-63. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.64.1.29>.
5. Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 2000;288:1647-1651. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1647>.
6. Hwang SS, Oh KJ, Jang IH, Uh Y, Yoon KJ, Kim HY, et al. Evaluation of the diagnostic performance of the AdvanSure TB/NTM real-time PCR kit for detection of mycobacteria. *Korean J Clin Microbiol*. 2011;14:55-59. <https://doi.org/10.5145/kjcm.2011.14.2.55>.
7. Park JS. Respiratory review of 2009: nontuberculous mycobacterium. *Tuberc Respir Dis*. 2009;67:395-401. <https://doi.org/10.4046/trd.2009.67.5.395>.
8. Siddiqi SH, Rsch-Gerdes S. MGITTM procedure manual for BACTECTM MGIT 960TM TB System. Geneva: Foundation for Innovative New Diagnostics; 2006.
9. Lim HJ, Lee JH. New Diagnostic Methods for Tuberculosis. *Korean J Med*. 2012;82:263-268. <https://doi.org/10.3904/kjm.2012.82.3.263>.
10. Kanchana M, Cheke D, Natyshak I, Connor B, Warner A, Martin T. Evaluation of the BACTECTM MGITTM 960 system for the recovery of mycobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 37:31-36. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(99\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(99)00151-0).
11. Bae ES, Im JH, Kim SW, Yoon NS, Sung HS, Kim MN, et al. Evaluation of combination of BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system and Ogawa media for mycobacterial culture. *Korean J Lab Med*. 2008;28:299-306. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2008.28.4.299>.
12. Sebastian G, Nagaraja S, Vishwanatha T, Voderhobli M, Vijayalakshmi N, Kumar P. Non-tuberculosis mycobacterium speciation using Hplc under Revised National Tb Control Programme (rntcp) in India. *J Appl Microbiol*. 2018;124: 267-273. <https://doi.org/10.1111/jam.13604>.
13. Ide S, Nakamura S, Yamamoto Y, Kohno Y, Fukuda Y, Ikeda H, et al. Epidemiology and clinical features of pulmonary non-tuberculous mycobacteriosis in Nagasaki, Japan. *PLoS One*. 2015; 10:E0128304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128304>.
14. Yang GE, Han H, Hong JY, Ohk TG. Comparison of CT findings of non-tuberculous mycobacterial pulmonary infection: disease stable versus progressed group. *JKS R*. 2018;79:57-62. <https://doi.org/10.3348/jksr.2018.79.2.57>.
15. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, ngeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013;42:1604-1613. DOI: 10.1183/09031936.00149212.
16. Lim HJ, Park CM, Park YS, Lee JW, Lee SM, Yang SC, et al. Isolation of multiple nontuberculous mycobacteria species in the same patients. *Int J Infect Dis*. 2011;15:E795-798. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.07.004>.