

결핵의 실험실진단에 있어서 비면역학적 기법의 이용

연세대학교 의과대학 미생물학교실

조 상 래

Laboratory Diagnosis of Tuberculosis Using Non-immunological Tools

Sang-Nae Cho, M.D.

Department of Microbiology, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

결핵의 실험실 진단 방법으로 현재 연구되고 있는 비면역학적인 방법을 살펴보면 먼저 결핵균을 신속하고 정확하게 동정하는 방법으로 (i) 결핵균의 지질성분을 화학적으로 분석하는 기술의 개발과 (ii) 결핵균의 특이한 DNA probe를 이용하려는 연구가 진행되고 있고 일부는 실용단계에 있다. 한편 가검물내의 결핵균을 직접 검출하는 방법으로서 역시 (i) 결핵균체나 결핵균의 구성성분을 화학분석을 통하여 결핵균의 존재를 확인하거나 또는 (ii) 결핵균의 핵산을 증폭하여 결핵균의 존재를 확인하게하는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 예로 들 수 있다. 따라서 본 란에서는 이러한 새로운 방법들을 검토하여 보고 결핵의 진단에 어떻게 이용될 수 있는가를 살펴보고자 한다.

결핵균의 동정 (Identification)

1. 화학분석을 이용한 결핵균의 동정

결핵균 세포벽의 주요 구성성분은 지질성분이며, 지질의 구성요소인 지방산은 그 조성이나 상대적인 양에 있어서 항산균의 종류마다 특이한 양상을 보인다고 한다¹⁾. 따라서 결핵균을 포함한 알려진 여러 종류의 항산균 지방산의 구성 성분을 분석하여 그 자료를 컴퓨터에 입력시켜 놓은 다음 조사하고자 하는 항산균을 배양하여

균체의 지방산 구성성분을 분석한 후 컴퓨터의 자료와 비교하여 동일한 구성을 가지는 항산균의 종류를 확인하는 방법이다. 화학분석에 주로 이용되는 기기는 gas-liquid chromatography (GLC)와 high performance liquid chromatography (HPLC)등이다. 그리고 화학 분석 과정은 전자동이 가능하여 시료 1개당 30분 정도면 분석이 가능하나, 분석에 필요한 지질성분을 충분히 얻으려면 균의 배양이 우선되어야 하기 때문에 결핵균을 직접 검출하는 경우보다는 장시간을 요한다. 그러나 통상적인 생화학적 검사에 의한 항산균의 동정 방법보다는 훨씬 신속하다고 볼 수 있다.

예를 들면 Tisdall등²⁾은 GLC를 이용하여 mycobacteria의 지방산을 비교분석하여 항산균의 종류를 구별할 수 있다고 보고하였으며, 가검물에서 분리한 320개의 항산균주를 GLC와 생화학적검사로 조사한 결과 GLC에 의해서 312개(97.5%)를 그리고 생화학적 검사에 의해서 316개(98.7%)를 각각 올바르게 분류할 수 있었다고 보고하였다. 그 밖에도 Buttler 등³⁾, Knisley 등⁴⁾, Maliwan등⁵⁾도 GLC, HPLC, TLC등의 화학적 분석법을 이용하여 결핵균을 정확하게 동정할 수 있었으며, 기타 항산균 종류도 상당히 높은 특이도로 분류가 가능하였다고 보고하였다. 이와 같이 항산균 지질성분을 비교 분석하여 그 종류를 신속하고 정확하게 분류할 수 있는 기술의 이용이 가능하게 되었다.

2. DNA Probe에 의한 결핵균의 동정

DNA probe을 이용한 결핵균의 감별법은 항산균의 각 종류마다 DNA의 배열이 특이한 점을 이용한다. 한 종류의 DNA 전체 부분이나 또는 일부분을 분리하여 방사성동위원소나 효소를 결합시켜 DNA probe을 우선 준비한다. 이어서 환자의 가검물이나 배양도중 결핵균으로 의심되는 집락의 균에서 DNA를 분리하여 DNA probe과 반응시켜 실험균의 DNA와 probe에 사용된 DNA 염기에 배열이 일치할 경우에만 결합반응이 일어나므로 이를 감지하여 항산균의 종류를 신속하게 알 수 있게 된다. DNA probe을 이용한 방법은 통상 10^6 개 이상의 균이 필요하므로 가검물로부터 직접 균을 모아 검사하기에는 어려움이 있어 균의 배양을 필요로 한다. 그러나 아주 작은 집락 하나만 있거나 액체배지배양법(예: BACTECH system)에 있어서 항산균 배양지수가 일정 수준에 도달하였을 때 곧 DNA probe을 이용하여 결핵균인지를 확인할 수 있어 통상적인 방법에 의한 집락의 색이나 형태 그리고 여러 생화학적 검사과정을 생략할 수 있어 신속한 진단이 가능하다. 또한 미국에서와 같이 가검물에서 결핵균이외의 항산균 분리율이 거의 50%나 되는 경우에는 DNA probe은 결핵의 진단에 있어서 아주 중요한 방법이 될 수 있다. 지금까지 상품화된 것에는 *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* 등에 대한 DNA probe이 있다.

그동안 DNA Probe을 이용하여 mycobacteria를 분류한 실험결과를 보면 *M. avium* probe의 경우 예민도는 93.4%, 특이도는 96.6%였다. 그리고 *M. tuberculosis*에 대한 DNA probe은 예민도 99.0%, 특이도 99.2%의 높은 예민도와 정확도를 보였다⁶⁾. 한편 Ellner등⁷⁾은 가검물로부터 항산균을 BACTECH system으로 배양하는 도중 일정 수준이상의 증식을 보였을 때 DNA probe을 이용하여 항산균의 종류를 분류한 결과 *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*가 배양된 290여개의 가검물 중 3분의 2에서 2주일 이내에 항산균의 종류를 확인할 수 있었다고 하며, 나머지 3분의 1도 4주일 이내에 모두 분류할 수 있어 통상적인 생화학적 검사방법보다 약 5~7주 가량 빠르게 항산균의 존재와 종류를 확인할 수 있었다고 하였다. 이와 같이 DNA probe은 어느 정도 균수에 이를 때까지 배양된 항산균을 신속하고 정확하게 분류할 수 있다는 장점이 있다. 또한

DNA probe은 그동안 ¹²⁵I 등 방사성동위원소를 사용하여 많은 실험실에서 다루기를 기피하였으나, 최근에는 효소-기질 반응을 이용한 DNA probe의 개발되어 보다 쉽게 실험실에서 이용할 수 있게 되었다.

가검물내 결핵균의 검출

1. 화학분석을 이용한 결핵균 구성분의 검출

위에서 기술한 바와 같이 결핵균이나 기타 항산균은 세포벽을 구성하는 지질성분 가운데 각 종류마다 특이한 지방산이나 mycolic acids 등이 존재한다. 따라서 가검물내 결핵균체나 또는 결핵균이 생산하였거나 자가분해되어 지질성분이 존재할 경우 화학분석을 이용하여 검출할 수 있게된다. 가검물에서 결핵균의 존재를 확인하기 위하여 종종 이용되고 있는 방법은 GC나 GC-Mass spectrometry (MS) 등으로 항산균에 존재하는 tuberculostearic acid의 검출이다.

French등⁸⁾은 가검물 중 도말검사와 배양검사에 모두 양성인 경우 모두에서 tuberculostearic acid를 GC-MS 법으로 검출할 수 있었으며, 도말검사에 음성이며 배양검사에 양성인 경우에서 66개 중 63개(95.5%)에서 tuberculostearic acid를 검출할 수 있었다고 보고하였다. 특이도는 도말검사와 배양검사에서 모두 양성인 300개의 가검물 가운데 단지 1개에서 tuberculostearic acid가 검출되어 99.7%의 높은 특이도를 나타내었다. 한편 Brooks등⁹⁾은 뇌척수액에서 tuberculostearic acid를 GLC로 검출하여 결핵성 뇌막염을 진단할 수 있었다고 한다. 이와 같이 화학분석법을 이용하여 가검물에서 직접 결핵균의 구성성분을 검출할 수 있다고하나 tuberculostearic acid는 항산균에 공통으로 존재하기 때문에 결핵균이라고 단정하기에는 문제점이 있다. 또한 고가의 장비를 설치해야하고 고도로 훈련된 사람을 갖춘 실험실이 많지 않아 실용화가 되기까지는 더 많은 보고가 있어야 하며 앞으로 좀더 주의를 해야 할 것이다.

2. PCR을 이용한 가검물내 결핵균 DNA의 검출

PCR이란 염기(nucleotides)의 배열을 알고 있는 핵산(DNA)의 특정 부위를 시험관내에서 효소를 이용해 합성하여 증폭시키는 과정을 말한다. 이 과정에는 선택적으로 증폭시키고자 하는 DNA의 양쪽 끝에서 안쪽으

로 약 20 base-pair (bp) 내외의 염기 배열에 대응 (complementary)하는 oligonucleotides인 primer가 2개 필요하며, primer는 DNA합성기를 이용하여 인공적으로 합성할 수 있다. 또한 증폭시키고자 하는 표적 DNA(target DNA)의 양쪽 끝 부분에 결합된 primer를 기점으로 target DNA의 염기 배열에 대응하는 nucleotide를 연속적으로 연결시켜 single strand (ss) DNA로부터 double strand (ds) DNA를 만들어 내는 DNA polymerase가 필요하다. 물론 이 과정을 효과적으로 일어나게 하는 데는 네 종류의 nucleotides, MgCl₂, KCl, Tris-HCl완충용액, gelatin등의 적정 농도가 필요하며, PCR을 반복하여 실행할 수 있는 thermocycler (일명 PCR machine)가 있어야 한다.

PCR과정을 살펴보면 반응에 필요로 하는 모든 요소를 혼합한 다음 thermocycler에 넣고 제1단계에서는 온도를 94~96°C로 올려 dsDNA를 ssDNA로 분리시킨다. 제2단계에서는 온도를 55~65°C로 낮추어 primer들이 target DNA의 끝 부분에 결합하도록 한다. 제3단계에서는 온도를 72°C로 높혀 결합된 primer를 기점으로 DNA polymerase로 하여금 target DNA염기배열에 대응하는 새로운 DNA를 합성하도록 한다. 이3단계의 과정을 자동적으로 반복하므로써 1개의 dsDNA로부터 target DNA 단편을 포함한 2개의 dsDNA가 합성되며, 2회 반복 후에는 4개, 그리고 3회 반복 후에는 8개의 dsDNA가 합성된다. 이중 2개는 DNA의 크기가 target DNA와 같은 크기가 되며, 4회 반복 후에는 합성된 16개의 DNA 가운데 8개의 target DNA가 합성되는 등 기하급수적으로 증폭된다. 이 과정을 25~30회 반복하는 동

안 target DNA 단편이 10⁵~10⁶개로 증폭되어 일반적인 gel electrophoresis나 DNA probe를 이용하여 쉽게 검출될 수 있다.

한편 PCR 방법에 의한 결핵의 진단은 결핵균에 특이한 DNA 부분을 시험관내에서 연쇄적으로 증폭하여 검출하거나 또는 여러 항산균에 공통되는 DNA 부분을 증폭한후 결핵균에 특이한 DNA probe를 이용하는 방법이 연구되고 있다¹⁰⁻¹⁸⁾(Table 1). 여러 연구자마다 증폭하고자 하는 결핵균 DNA의 부분이 다르지만 이론적으로 하나의 결핵균에서 얻은 DNA나 그 일부만 있어도 4~5시간 이내에 100만개 이상의 DNA 복제물을 얻을 수 있어 전기영동으로 증폭된 DNA를 검출할 수 있게 된다. 실제로 많은 연구보고들이 1~10개의 결핵균이 존재할 경우에는 PCR 방법에 의해 DNA를 검출할 수 있다고 하였으며, 우리나라에서도 본 발표자를 비롯 몇곳의 실험실에서 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 결핵균에 특이한 DNA를 검출하므로 다른 항산균으로부터 결핵균을 감별하는 데는 거의 100% 특이도를 보여주고 있다. 그리고 PCR 방법의 또 다른 이점은 가검물 채취후 12시간 정도면 결과를 얻을 수 있으며, 임상실험실에서 24~48시간에 결과보고를 낼 수 있다는 점이다.

그러나 아직까지 PCR 방법을 결핵의 진단이나 환자의 치료관리에 이용한 예는 거의 없다. 다만 가검물에서 배양검사 또는 도말염색후 현미경검사와 PCR 결과를 비교한 보고를 보면, 배양검사에서 양성인 가검물에서는 PCR역시 거의 100% 양성률을 보여 민감도에 있어서는 배양검사 결과와 일치하였다. 그러나 배양검사 음성인 가검물에서도 30~40% 가량의 PCR 양성률을 보

Table 1. PCR for the Detection of *M. Tuberculosis* DNA

Reported by	Target DNA coding	Products (bp)	DNA probe required	Reference No.
Hance, et al. (1989)	65 kDa	383	Yes	10
Patel, et al. (1990)	ND*	1,016	Yes	11
Eisenach, et al. (1990)	IS 6110	123	No	12
Shankar, et al. (1990)	ND	240	Yes	13
Hermans, et al. (1990)	ND	158	No	14
Pao, et al. (1990)	65 kDa	165	No	15
Plikaystis, et al. (1990)	65 kDa	347	No	16
Sjobring, et al. (1990)	38 kDa	419	No	17
Thierry, et al. (1990)	IS 6110	325	No	18

* not defined.

여 결핵진단의 기준을 결핵균 배양검사 양성으로 정할때 그 특이도는 60~70%로 매우 낮다고 할 수 있다¹⁵⁾. 그러나, 본 발표자의 연구결과에 의하면 정상건강인의 가검물에서는 배양음성인 경우 모두에서 PCR 음성이었으므로, 결핵의 경력 유무에 관계 없이 호흡기내과에 내원한 환자의 가검물을 의뢰한 경우에는 배양검사 음성인 가검물 중 40%에서 PCR양성결과를 보인점은 실제로 결핵균이 존재하였음을 강력히 제시하고 있다. 물론 화학요법에 의해 죽은 결핵균이나 가검물 처리도중 NaOH에 의해 죽은 결핵균도 PCR방법에 의해 모두 검출될 수 있기 때문에 앞으로 PCR 결과를 결핵의 진단이나 환자의 진료에 어떻게 이용하는가가 주요 연구과제라 하겠다.

맺 음 말

이와같이 화학분석법이나 분자생물학적 기법의 발달로 가검물에서 결핵균을 예민도와 특이도가 높으며 신속하게 검출할 수 있게되어 결핵의 실험실 진단방법에도 큰 변화가 있을 것으로 예상된다. 그러나 아직까지는 검사비용이 많이 들고 그 기법이 고도의 기술훈련을 요하고 있으므로 앞으로 보다 보편화될 수 있는 간단한 방법으로 변화시키는 것이 큰 과제라 하겠다. 아울러 새로운 기술을 이용하여 얻은 결과와 결핵의 진단이나 환자의 임상결과와의 비교에 있어서 많은 연구가 선행되어야 할 것이다.

REFERENCES

- 1) Rattledge C, Stanford J (ed): The Biology of the Mycobacteria, Vol 1, Physiology, Identification and Classification. Academic Press, London U K, 1982
- 2) Tisdall PA, DeYoung DR, Roberts GD, Anhalt JP: Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography: a 10-month follow-up study. J Clin Microbiol 16:400-402, 1982
- 3) Butler WR, Kilburn JO: High-performance liquid chromatography patterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis*. J Clin Microbiol 28:2097-2098, 1990
- 4) Knisley CV, Damato JJ, McClatchy K, Brennan BJ: Rapid and sensitive identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 22:761-767, 1985
- 5) Maliwan N, Reid RW, Pliska SR, Bird TJ, Zvetina JR: Identifying *Mycobacterium tuberculosis* cultures by gas-liquid chromatography and a computer-aided pattern recognition model. J Clin Microbiol 26:182-187, 1988
- 6) Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts CD: Identification of mycobacteria from culture by using the Gene-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 26:2120-2123, 1988
- 7) Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M: Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. J Clin Microbiol 26:1349-1352, 1988
- 8) French GL, Chan CY, Cheung SW, Oo KT: Diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of tuberculostearic acid in sputum by using gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. J Infect Dis 156:356-362, 1987
- 9) Brooks JB, Daneshvar MI, Haberberger RL, Mikhail IA: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by frequency-pulsed electron-capture gas-liquid chromatography detection of carboxylic acids in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 28:989-997, 1990
- 10) Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D, Raugier J, Bocart D, Gicquel B: Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol 3:843-849, 1989
- 11) Patel RJ, Fries JW, Piessens, 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
- 12) 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
- 13) Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, Aditi B, Seth P, Shriniquas: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. Lancet i:423, 1990
- 14) Hermans PWM, Schuitema ARJ, Van Soolingen D, Verstynen CPHJ, Bik EM, Thole JR, Kolk AHJ, Van Embden JDA: Specific detection of *Mycobacter-*

- ium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol **28**:1204-1213, 1990
- 15) Pao CC, Benedict Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol **28**:1877-1880, 1990
 - 16) Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM: Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J Clin Microbiol **28**:1913-1917, 1990
 - 17) Sjobring U, Meckenburg M, Andersen AB, Miorner H: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol **28**:2200-2204, 1990
 - 18) Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B: Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol **28**:2668-2673, 1990