

흉막삼출액에서 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 이용한 결핵균의 검출에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실, 한림대학교 의과대학 내과학교실*, 단국대학교 의과대학 내과학교실**

김 호 중* · 김 영 환 · 한 성 구
심 영 수 · 김 건 열** · 한 용 철

= Abstract =

Identification of Mycobacterium Tuberculosis in Pleural Effusion by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hojoong Kim, M.D.,* Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.
Keun-Youl Kim, M.D.** and Yong Chol Han, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Hallym University Medical College, and Tankuk University Medical College,** Seoul, Korea*

Background: By amplifying small amount of DNA, polymerase chain reaction (PCR) can be used for the detection of very small amount of microbial agent, and may be especially useful in certain cases which are difficult to be diagnosed microbiologically or serologically. Tuberculous pleurisy is a disease that can be diagnosed in only 70% of cases by conventional diagnostic tools, and PCR would be a very rapid, easy, and sensitive diagnostic method.

Method: The specificity and sensitivity of PCR to detect Mycobacterium tuberculosis DNA were evaluated using various strains of Mycobacteria. To evaluate the diagnostic usefulness of PCR in tuberculous pleurisy, we used PCR to detect Mycobacterium tuberculosis DNA in pleural fluid. The amplification target was 123 base pair DNA, a part of IS6110 fragment, 10~16 copies of which are known to exist per genome. The diagnostic yield of PCR was compared with conventional methods, including pleural fluid adenosine deaminase (ADA) activity. Also, the significance of PCR in undiagnosed pleural effusion was evaluated prospectively with antituberculosis treatment.

Results:

- 1) Using cultured Mycobacterium tuberculosis and other strains, PCR could detect upto 1 fg DNA and specific for only Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis.
- 2) Using pleural effusions of proven tuberculosis cases, the sensitivity of PCR was 80.0% (16/20), and the specificity 95.0% (19/20).
- 3) Among 13 undiagnosed, but suspected tuberculous effusion, the positive rate was 60% in 10 improved cases after antituberculosis medications, and 0% in 3 cases of proven malignancy later.
- 4) Adenosine deaminase level of proven and clinically diagnosed tuberculous pleurisy patients was significantly higher than that of excluded patients, and correlated well with PCR results.

본 연구는 1993년도 서울대학교병원 지정연구비의 보조로 이루어 졌음.

본 논문의 요지는 1992년도 제 75 차 대한결핵 및 호흡기학회 추계학술대회 및 1993년도 미국흉부질환학회 세계학술대회 석상에서 발표 되었음.

Conclusion: We can conclude that PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural effusion has acceptable sensitivity and specificity, and could be an additional diagnostic tool for the diagnosis of tuberculous pleurisy.

Key Words: Tuberculosis, Pleural effusion, PCR, ADA

서 론

결핵성 흉막 삼출은 아직까지도 우리나라에서 가장 흔한 흉막 삼출의 원인으로 생각되고 있다. 그러나 흉막삼출액에서 항산성 간균을 직접 검경하기는 매우 드문 일이며, 항산균 배양의 성적도 가장 높게 보고된 것이 25%이다. 방사선학적으로도 폐실질내 병변을 동반한 경우가 약 1/3로 알려져 있고 투베르쿨린 피부 반응의 결과도 양성율이 30% 정도에 불과하여 진단에 도움을 주지 못하고 있다. 기존의 진단 방법중에 현재 가장 진단율이 높다고 알려져 있는 것이 흉막의 생검 소견인데 이것도 약 60%의 진단율을 보고하고 있다. 물론, 젊은 연령의 급성 흉막염의 임상상을 보이며, 림프구 주종의 흉막 삼출을 호소하는 환자에서, 만성 피로감이나 체중 감소, 야간 발한등의 전신 증상을 동반하는 경우에는 임상적으로 결핵성 흉막염의 진단을 내리고 일단 항결핵제제를 투여하는 것이 타당할 수 있다. 그러나 고연령층이나 면역이 억제된 환자, 신부전, 간부전이 있는 환자에서 기존의 진단 방법으로 진단되지 않으며 여러가지 시험 치료에 반응하지 않는 흉막 삼출의 경우에는 임상적으로 어려움을 겪게 되고, 더우기 악성 흉막 삼출과의 감별이 어려운 경우 보다 예민한 진단 방법의 필요성을 절실히 느끼게 되며, 이의 개발을 위해 여러 분야의 노력이 있어 왔다^{1,3,18)}.

중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함)은 어느 특정한 DNA를 연속적으로 복제할 수 있어 분자 생물학의 여러 분야에서 매우 유용한 연구 수단이 되고 있다. 따라서 PCR은, 검체내에 극미량으로 존재하고 있는 병원체의 진단에 이용되고 있으며, 이는 특히 기존의 미생물학적, 면역 혈청학적 방법으로 진단이 어려운 병원체의 진단에 큰 도움을 주고 있다. 결핵균을 이용한 PCR은 Brisson 등³⁾이 1989년 *Mycobacterium species*의 특이 단백질인 65 kD *Mycobacterial Antigen*을 encoding 하는 2520 base pair 유전자의 일부인 383 base pair DNA를 TB-1,

TB-2로 명명한 primer로 시행한 이래 Shankar⁵⁾, Pao⁶⁾, Hermans⁷⁻⁸⁾, De Wit⁹⁾, Eisenach¹⁰⁻¹¹⁾, Patel 등¹²⁾이 새로운 특이 primer를 개발하였고, 현재에는 결핵균의 한 개체에 여러번 반복하여 존재하는 insertion element를 목표로 하는 PCR이 그 예민도가 가장 뛰어나다는 것이 보고되고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

PCR을 이용하여 흉막삼출액에서 결핵균을 검증한 실험은 Brisson³⁾, Pao⁶⁾, De Wit⁸⁾, Thierry¹³⁾, Lassence 등¹⁵⁾이 결과를 발표한 바 있으나, Pao⁶⁾의 37예 보고 이외에는 모두 약 10예 내외에 불과하며, 또한 항산균 도말, 배양의 성적과 비교한 것이었다. 따라서 임상적인 결과와 비교해 보지 않았기 때문에, 도말/배양이 음성이며 PCR이 음성인 경우에 대한 해석이 안된다는 것이 가장 큰 문제로 남아 있었다. 한편 결핵성 흉막염 환자에서 흉막삼출액내 adenosine deaminase(이하 ADA로 약함) 활성도가 증가되어 있다는 것은 이미 알려진 사실이며²²⁾, 특히 림프구 주종의 흉막삼출액에서 결핵성 흉막염을 감별 진단하는데 매우 우수하다는 것이 알려져 있다²³⁻²⁴⁾.

본 연구자들은 흉막 삼출을 가진 환자들에서 삼출액내의 ADA 활성도를 측정하고, 동시에 PCR을 이용하여 결핵균 검출을 시행하여, 이를 임상적인 결과와 비교해 봄으로써, PCR의 진단적 가치와 그 유용성을 입증해 보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1992년 1월 1일부터 1992년 7월 31일까지 서울대학교 병원 내과에 입원한 환자중 흉막 삼출을 가진 환자를 대상으로 하였다. 환자는 총 53명이었으며, 결핵성 흉막염이 확진된 환자들이 20명(제 1군), 악성 흉막 삼출, 전신적 부종과 동반한 흉수 저류 및 간경화에 동반한 흉막 삼출 등 결핵성 흉막 삼출이 배제된 환자들이 20명(제 2군)이었다. 그리고 미생물학적이나 조직 병리학적으로 결핵이 확진되지 않았으나 임상적으로 결핵으로 의심하

Table 1. Profiles of Studt Population

Group	Characteristics	Number of cases
Group 1	Proven tuberculous	20
	Granuloma with caseation on Bx	14
	Sputum AFB (+), but effusion (-)	6
Group 2	Proven non-tuberculous	20
	Malignant pleural effusion	12
	Congestive heart failure	5
	Liver cirrhosis	3
Group 3	Clinically suspected tuberculous pleural effusion, and improved after medication	10
Group 4	Clinically suspected tuberculous pleural effusion, but proven malignancy later	3
Total		53

여 항결핵제제를 투여한 후 호전된 환자들이 10명(제 3 군), 임상적으로 결핵으로 의심하였으나 결핵 치료후에도 호전되지 않았으며 반복적인 진단 과정에서 결핵 이외의 질환으로 확진된 환자가 3명(제 4 군)이었다 (Table 1).

2. 방 법

1) 흉수 천자 및 보관

흉수는 입원후 즉시 천자하였으며, 일반적인 진단 검사를 의뢰하였다. 또한 PCR을 위해서는 0.5 ml씩 멸균적으로 분주한 5개의 검체를 -70 °C 냉장고에 즉시 보관하였고, 같은 검체를 원심 분리후 상층액을 -20 °C에 보관하여 ADA 활성도를 측정하였다.

2) PCR 방법

① DNA의 추출

Hurley 등²¹⁾의 방법을 수정하여 DNA를 추출하였다. 즉 2 ml screw-tube에 천자한 흉수 200 μ l를 넣은 후, 0.1 mm Zirconium Bead 200 μ l, TEN buffer 100 μ l, PCI solution 100 μ l를 넣고, mini-Bead beater에서 3분간 처리하여 세포를 파괴함과 동시에 단백질을 변성시켰다. 검체를 3000 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 투명한 상층액 200 μ l를 새로 micro-tube에 옮기고 CI

solution 200 μ l를 넣고 30초간 서서히 흔든 다음, 다시 3000 rpm으로 5분간 원심분리하는 과정을 2회 반복하였고 상층액을 새 micro-tube에 옮겼다. 이에 3 M Sodium Acetate 10 μ l를 넣은 후, 100% 냉동 Ethanol 220 μ l를 넣고, -70 °C 냉장도에 15분 이상 둔후 10000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 이의 상층액을 vacuum suction을 이용하여 제거하고, 여분의 용매를 완전히 건조시킨후 증류수 100 μ l에 용해시켜 -20 °C에 보관하였다.

② Primer의 합성

Primer로는 Eisenach 등¹¹⁾의 IS-1 (5' -CCT-GCGAGCGTAGGCGTTCGG-3')과 IS-2 (5' -CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3')를 DNA 합성기로 합성하여 사용하였다.

③ PCR을 이용한 DNA의 복제

10배 reaction buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl: pH 8.3, 24 mM MgCl₂, 1 mg/ml gelatin) 10 μ l, 각 1.25 mM dNTP 혼합액 16 μ l(각 총 200 μ M), 2쌍의 primer 5 μ l(각 총 50 pM), 증류수 13.5 μ l와 흉수에서 분리한 DNA 전체 50 μ l를 넣고 mineral oil을 50 μ l씩 넣은 후 pre-heating 하고, 50 U/ μ l Taq Polymerase 0.5 μ l (2.5U)를 넣어 반응시켰다. Automatic thermal cycler에서 pre-heating은 95 °C에서 5분간, annealing은 68 °C에서 1분간, extension은 71 °C에서 1분간, last extension은 71 °C에서 10분간 하여, 총 35회를 시행하였다. PCR이 끝나면 30 °C로 식을 때까지 기다린 후 -20 °C에 보관하였다.

④ 전기 영동

Agarose Gel 2%와 NuSieve Gel 2%를 혼합하여 TAE buffer에 총 4%가 되게 넣고 가열하여 녹인 후, 60 °C에서 10 mg/ml의 ethidium bromide 3% volume으로 염색하였다. 이에 PCR한 검체 10 μ l와 gel load buffer 2 μ l씩을 섞어 well에 넣었고 크기를 아는 size marker와 함께 100 V의 직류로 약 1시간 동안 전기 영동한 다음, 260 nm의 자외선 발광경하에서 123 base pair 크기의 band를 확인하고 사진을 찍었다.

⑤ 양성 및 음성 대조군

검체에 대한 본 실험에 앞서 IS-1, IS-2 primer를 이용한 PCR의 특이성을 증명하기 위하여 Mycobacterium tuberculosis 균주로서 H37Rv (ATCC 27294)와 H37Ra (ATCC 25177)를, non-tuberculous

Mycobacterium 종으로는 *Mycobacterium intracellulare* (ATCC 13950)와 *Mycobacterium bovis* (ATCC 19210), *Mycobacterium scrofulaceum* (ATCC 19981)의 DNA를 분리하여 1 ng을 사용하였고, 감수성을 증명하기 위하여서는 H37Rv 균주에서 분리한 DNA를 순차적으로 회석하여 사용하였다. 또한 검체에 대한 실험에 있어서는 양성 대조군으로는 배양된 표준 균주인 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294)에서 DNA를 분리하여 검사당 1 pg을 사용하였고, 음성 대조군으로는 증류수를 DNA 분리 과정에서부터 동일 과정을 시행하여 사용하였다. 모든 실험 과정에서 오염 방지를 위한 제반 수칙을 준수하였으며, 특히 PCR 이후의 복제된 DNA가 있을 tube는 100 m 정도 거리가 떨어진 타 건물로 옮겨 전기 영동하고, 결과를 판독하였다. 또한 오염에 의한 위양성의 오류를 줄이기 위해, 동일한 환자의 검체를 3회 실험하여 2회 이상 양성으로 나온 경우 PCR 양성으로 판독하였다²⁵⁾.

⑥ Southern Blot 분석

표준 균주를 사용한 실험에서는 특이성을 검증하기 위하여, Nylon membrane에 전이하여 Southern Blot 분석을 하였다. Probe로는 IS-3 (5'-GTCGACACA-TAGGTGAGGTC-3')을 사용하였으며, T₄ kinase를 사용하여 [³²P] ATP로 5'-end labelling하여 42 °C에서 20시간 동안 hybridization한 후 -70 °C에서 24시간 동안 autoradiography를 시행하였다.

3) ADA 활성도의 측정 방법

ADA 활성도의 측정은 표준 방법으로 측정하였다. 즉 adenosine 기질에서 ADA의 작용으로 유리되는 암모니아를 NaCl과 반응시켜 염화암모늄을 만들고, 이를 다시 phenol과 반응시켜 생성되는 indophenol을 spectrophotometer로 측정하여 표준 곡선과 비교하여 환산하였다²²⁾.

결 과

1. PCR의 특이성과 감수성

1) PCR의 특이성

특이성을 검증하기 위하여 시행한 *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv, H37Ra)와 *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium scrofulaceum*의 PCR은 자외선 발광경하에서 *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv, H37Ra)와 *Mycobacterium bovis*만이 123 base pair 위치에 band를 보여 양성을 나타내었고, 이는 Southern Blot 분석에서도 확인되었다(Fig. 1).

2) PCR의 감수성

감수성을 알아보기 위하여 *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv)의 DNA를 순차적으로 회석하여 PCR을 시행하였는데, 자외선 발광경하에서도 *Mycobacterium* 균 1개체에 해당되는 1 fg DNA까지

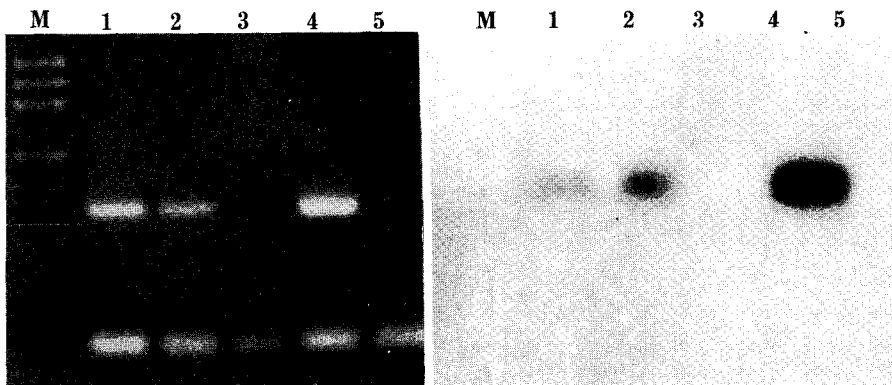


Fig. 1. Specificity of PCR using cultured *Mycobacterium* species after ethidium bromide staining (A) and Southern blot analysis using IS-3 probe (B). The primer was IS-1& IS-2. M: Size Marker, lane 1: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) 1ng, lane 2: *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) 1ng, lane 3: *M. intracellulare* (ATCC 13950) 1ng, lane 4: *M. bovis* (ATCC 19210) 1ng, and lane 5: *M. scrofulaceum* (ATCC 19981) 1ng

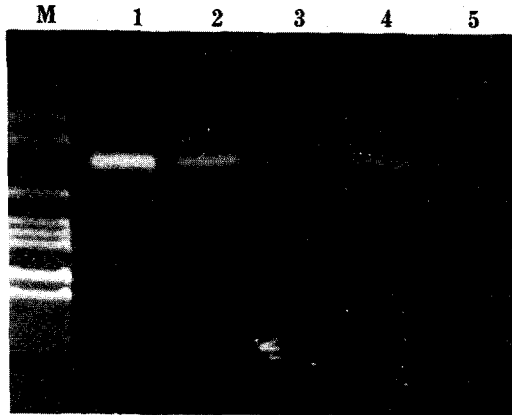


Fig. 2. Sensitivity of PCR using serial dilution of DNA from *M. tuberculosis* after ethidium bromide staining and UV transilluminator. The primer was IS-1&IS-2. M: Size Marker lane 1: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) lpg, lane 2: 100 fg, lane 3: 10 fg, lane 4: 1 fg, lane 5: negative control

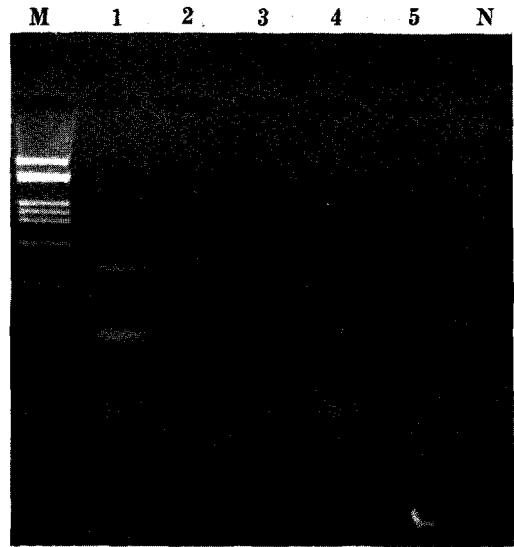


Fig. 3. Agarose electrophoresis of PCR product using DNA extracted from pleural effusion as template. The primer was IS-1&IS-2. M: Size Marker, lane 1: positive control - *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) lpg, lane 2, 3: proven tuberculous pleural effusion, lane 4: proven malignant pleural effusion, lane 5: negative control of DNA extraction, lane 6: negative control of PCR

양성을 나타내었다(Fig. 2).

2. 흉수에서의 PCR 및 ADA 활성도

1) 확진된 환자군에서의 PCR 및 ADA 활성도

결핵성 흉막 삼출로 확진된 제 1군의 20명의 환자의 흉수중, 16예에서 PCR 결과가 양성으로 나와 80.0%의 양성율을 보였다. 소군별로 보면 흉수에서 결핵균 배양 양성이었거나 흉막 생검상 건락성 괴사를 동반한 육아종을 보인 14예중 13예에서 양성을 보여 92.9%의 양성율을 보인 반면, 흉수나 흉막에서 결핵의 증거없이 객담에서만 도말/배양 양성을 보인 6예에서는 3예만이 양성을 보여 50%의 양성율을 나타내었다. 한편 결핵이 배제된 흉막 삼출 20예중에서 악성 흉막 삼출 1예에서만 양성을 나타내어 5.0%의 위양성율을 나타내었다. ADA 활성도는 제 1군이 118.8 ± 23.6 IU/L, 제 2군이 23.7 ± 3.2 IU/L로서 두군간에 뚜렷한 차이를 보였으며(Fig. 4), 모듬²⁶⁾이 제시한 40 IU/L 이상을 결핵성 흉막 삼출의 진단 기준으로 설정하였을 때, 제 1군에서 1예(5.0%)의 위음성을, 제 2군에서 2예(10.0%)의 위양성을 나타내었다(Fig. 3, Table 2).

2) 임상적으로 결핵이 의심된 환자군에서의 PCR 및 ADA 활성도

미생물학적이거나 조직 병리학적으로 결핵이 확진되지

않았으나 임상적으로 결핵으로 의심하여 항결핵제제를 투여한 후 호전된 환자 10명중 6명에서 흉수의 PCR 결과가 양성으로 나와 60.0%의 양성율을 보였다. 이를 소군별로 보면 임파구 주종의 흉막 삼출만을 보이는 환자 6명중 2명만에서 PCR 결과가 양성으로 나온 반면, 폐실질의 침윤을 동반한 흉막 삼출 4예에서는 모두 양성을 보였다. 또한 임상적으로 결핵으로 의심하여 항결핵제제를 투여하였으나 호전되지 않고 반복적인 진단 과정에서 결핵이 배제된 환자가 3명이었는데 이들의 PCR 결과는 모두 음성이었다. ADA 활성도는 제 3군이 83.7 ± 11.2 IU/L, 제 4군이 28.3 ± 3.5 IU/L로서 두군간에 뚜렷한 차이를 보였으며(Fig. 4), 제 3군은 제 2군과도 유의한 상관 관계가 있었다. 40 IU/L 이상을 결핵성 흉막 삼출의 진단 기준으로 설정하였을 때, 제 3군에서 1예(10.0%)의 위음성을 보였으며 제 4군에서는 모두 양성을 나타내었다(Table 3).

Table 2. PCR Results and ADA Activities of Proven Tuberculous and Non-tuberculous Pleural Effusions

Group	PCR positive cases	ADA activities (IU/L)
Group 1 (Proven tuberculous)		
Total	16/20 (80.0%)	118.8±23.6
Granuloma with caseation on Bx	13/14	
Sputum AFB (+), but effusion AFB (-)	3/6	
Group 2 (Proven non-tuberculous)		
Total	1/20 (5.0%)	23.7±3.2**
Malignant pleural effusion	1/12	
Congestive heart failure	0/5	
Liver cirrhosis	0/3	

*: data shown as mean ± standard error **: p < 0.001 compared with Group 1

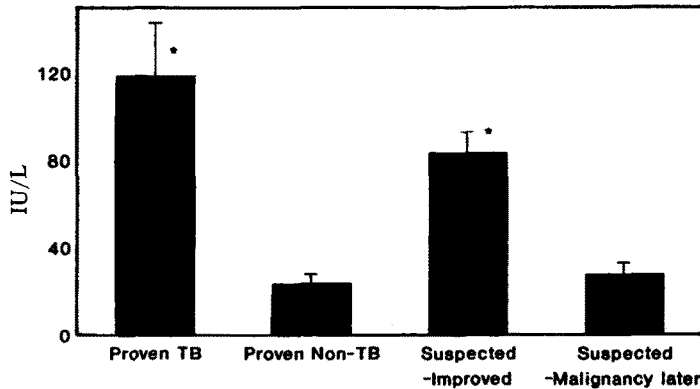


Fig. 4. Adenosine deaminase activities in various groups of pleural effusion.
*p < 0.05 compared with proven non-TB group

고찰

PCR을 이용하여 결핵균을 검증하는 방법은 1989년 Brisson-Noel등³⁾이 결핵균에 특이성을 갖는 primer를 발견함으로써 시작되었으며, 그후 1991년까지 3년내에 10여종의 결핵균에 특이성을 갖는 primer가 발견되어⁴⁻¹²⁾ 여러 사람의 많은 관심을 받게 되었다. 결핵균을 검증하는 PCR의 예민도는 배양된 결핵균을 대상으로 하였을 때, 결핵균 5~1000 개체까지도 검출 가능하다고 발표되어^{4,9-10)} 항산성균 배양(약 1000개체가 필요함)보다 월등히 우수하다고 알려졌었다. 그러나 실제로 임상 검체에서 PCR을 시행하였을때, 예민도는 낮아져서 단순한 전기 영동후 자외선 발광경하에서 육안으로

관찰할때는, 항산성균 배양과 비슷한 정도의 예민도를 보이며, Southern blot을 하여 동위원소를 이용한 검출을 하여야만 배양보다 우수한 성적을 보고하게 되었다^{9,13)}. 이는 아마도 PCR 자체의 예민도가 낮기 때문이라기보다는, 검체에서 DNA를 분리하는 과정에서 DNA가 파괴되거나 DNA의 분리가 순수하지 못하여 공존하는 물질들이 PCR을 방해하기 때문으로 생각되고 있다^{25,27)}. 그러나 결핵균 1개체내에 10~16번 반복하여 존재한다고 알려진 IS6110이라는 부위를 목표로 한 PCR primer를 Eisenach등이 발표한 이후¹¹⁾, 이에 대한 연구가 결핵균 PCR의 새로운 발전을 가져오게 하였다. 즉 이 primer를 이용하여 임상 검체에서 PCR을 하였을때, 전기 영동후 자외선 발광경하에서 육안으로 관찰할때에도, 결핵균 10~100개체도 검출이 가능하다는

Table 3. PCR Results and ADA Activities of Clinically Suspected Tuberculous Pleural Effusion

Group	PCR positive cases	ADA activities (IU/L)*
Group 3 (Improved after medication)		
Total	6/10 (60.0%)	83.7±11.2**
Lymphocyte predominant effusion	2/6	
Poly predominant effusion	4/4	
Group 4 (Not improved and TB excluded)		
Total	0/4 (0.0%)	28.3±3.5
Malignant pleural effusion	0/3	
Bacterial parapneumonic effusion	0/1	

*: data shown as mean±standard error

** : p<0.01 compared with Group 2 and Group 4

것이 발표되었다¹⁰⁾. IS-1과 IS-2라고 불리는 이 primer는 우선 결핵균 한 개체내에 여러번 반복하여 존재하는 부위를 목표로 함으로써, 이론적으로 그 배수만큼 예민도가 높아지게 되었다. 그리고 목표 DNA인 IS6110 fragment의 길이가 123 base pair 밖에 되지 않기 때문에 검체에서 DNA를 분리하는 과정에서 DNA가 손상되더라도 다른 primer보다 우수한 결과를 얻을수 있다고 생각된다. 또한 이 primer의 GC content(전체 핵산 염기 배열에서 guanosine과 cytosine이 차지하는 비율)가 75%로서 기존의 이상적인 수준인 50%를 훨씬 상회하고 있는데, 위양성율이 높을 것이라는 우려와 달리 적절한 annealing 온도만 설정하면 좋은 결과를 나타내고 있다. PCR 방법의 차이에 따른 검체에서의 결핵균 발진도를 연구한 논문들^{14,18)}에서 IS-1, IS-2 primer는 다른 primer보다 우수하다는 것이 입증되고 있어, 이제 결핵균을 이용한 PCR에서는 primer의 선정이 IS-1, IS-2로 단일화되어 가는 추세라고 할 수 있다. 저자들도 환자의 객담을 이용한 결핵균 PCR에서 IS-1, IS-2 primer의 우수성을 보고한 바 있으며¹⁶⁾, 본 연구에서는 이 primer만을 이용하여 실험을 하게 되었다.

결핵균을 이용한 PCR에서 또 한가지 매우 중요한 문제는 검체에서의 DNA의 분리 방법이다. 전술한 바와 같이 임상 검체를 이용한 PCR의 예민도가 배양한 결핵균주를 이용한 PCR의 예민도보다 낮은 이유가, DNA를 분리하는 과정에서 Taq polymerase의 활성도를 약화시키는 물질을 완전히 제거하지 못하기 때문이라고 생각되고 있다^{25,27)}. 이러한 물질로 잘 알려진 것들이 hemoglobin, sodium dodecyl sulfate (SDS), phenol

등이 있으며¹⁸⁾, 분리된 DNA에 다량의 단백질이나 탄수화물이 남아있는 경우도 DNA의 hybridization을 방해한다고 알려져 있다. 본 연구자들은 이러한 방해 요소를 최소화하기 위하여 DNA 분리 방법을 물리적 분쇄 방법인 bead beater 방법을 사용하였으며, phenol도 1회사용 후에는 chloroform/isoamyl alcohol로 2회 세척하는 방법을 사용하였다. 흉수액내의 대부분의 DNA의 출처는 부유하고 있는 임파구, 대식구, 중피 세포, 그리고 악성 세포 등으로 생각할 수 있으며, 결핵균은 주로 대식구내에 탐식된 상태로 존재한다고 생각된다. 따라서 검체에서 DNA를 분리하기 전에, 결핵균이 대식세포등에 의해 용해되는 것을 막기위해 천차 즉시 저온 보관하였다. 일반적으로 결핵성 흉막염환자의 흉수의 항산성균 배양의 성적이 25% 이하인데 비해, 흉수 5ml을 천차 즉시 그자리에서 BACTEC media에 접종시킨 연구에서 47%의 양성율을 보고하고 있어¹⁾, 흉수의 양보다는 보관의 신속성이 중요하다고 생각된다.

기존의 진단 방법으로 결핵성 흉막염으로 확진된 20명의 환자중에서 PCR 결과는 16명이 양성을 보였는데, 4명의 음성 결과를 보인 환자중 3명은 흉수나 흉막 생검 소견상 결핵의 증거를 보이지 않았던 환자였다. 따라서 엄밀한 의미에서 본다면, 흉수나 흉막 소견상에서 결핵의 증거가 있었던 14명의 환자중 13명에서 PCR 양성을 보였으므로 92.9%의 양성율을 보였다고 생각할 수 있는데, 이는 외국의 여러 보고^{13,15,18)}와 매우 유사한 결과이다. 그리고 결핵이 배제된 20명의 흉막 삼출 환자중 1명에서 위양성을 보여 5.0%의 위양성을 보였는데, 이 또한 외국의 보고와 크게 다르지 않으며, PCR도 이의 이

론적인 예민성과 특이성에도 불구하고 아직까지는 약 5~10%의 위양성율과 위음성율이 있다고 생각되고 있다.

한편 홍막액내의 ADA 활성도는 결핵균과 비결핵균 간에 뚜렷하게 차이가 나서 기존의 보고²³⁻²⁴⁾와 같은 결과를 보이고 있다. 결핵성 홍막염에 대한 ADA 활성도의 진단 기준을 40 IU/L로 설정하였을 때, 위양성율 10.0%, 위음성율 5.0%였으며, 이러한 ADA 활성도는 결핵성 홍막염의 진단에, 특히 임파구 주종의 홍막 삼출에서, 매우 유용한 방법이라는 것을 다시 한번 입증하였다. 그리고 PCR이나 ADA 활성도에서 위양성이나 위음성을 나타낸 환자들은 전혀 일치하지 않았다. 홍막 삼출 환자군에 확진된 환자군 외에 기존의 진단 방법으로 확진되지 않고 임상적인 경험으로 결핵으로 추정하여 항결핵제제를 투여한 환자군에 있어 PCR과 ADA 활성도를 측정할 점이 본 연구의 특징이라고 할 수 있다. 즉 PCR이라는 진단 방법이 기존의 방법으로 진단이 어려운 환자군에서 어느 정도 유용한가를 보기 위해서는 이러한 추정 진단 환자군을 대상으로 하였는데, 매우 의미 있는 결과를 보여주고 있다. 항결핵제제 투여 후 호전된 환자군은 총 10명으로 이중 6명에서 PCR 양성을 나타내었다. 그중 폐실질의 병변이 없이 임상적으로 흉수를 주증상으로 하는, 주로 젊은 연령의, 임파구 주종의 홍막 삼출 환자중, 흉수나 홍막 생검 소견에서 결핵의 증거가 없었을 때, PCR은 6명중 2명인 33.3%의 양성율을 보이고 있다. 이는 이러한 환자군에서 홍막 삼출의 기전이 주로 파민성에 기인할 것이라는 가설과 일치하는 결과이며, ADA 활성도는 6명중 5명이 40 IU/L 이상으로서 이러한 환자군의 진단에 있어 PCR보다 우수할 것으로 생각된다. 반면 이러한 임상상과는 달리 고령층의 홍막 삼출을 가진 환자에서, 특히 폐암을 의심하게 하는 증양을 동반한 환자들중에서, 여러가지 기존의 진단 방법으로 진단이 안되는 환자중 4명이 항결핵제제 투여 후 호전되었는데, 이들 모두에서 PCR 양성, ADA 활성도 40 IU/L 이상을 보이고 있다. 또한 호전되지 않고 결국 추후에 다른 진단이 내려진 4명의 환자 모두에서 PCR 음성, ADA 활성도 40 IU/L 이하를 보이고 있다. 물론 전향적 연구가 아니었으므로 환자의 선택에서부터 편견이 개입되었을 가능성이 있고 환자군의 수가 너무 적어 성급한 결론을 내리기는 어렵지만, 임상에서 흔히 부딪히는 이러한 환자들의 진단에 PCR이 도움을 줄수 있을

것이라는 기대를 갖게 하고 있다. 향후 보다 많은 환자를 대상으로 한 전향적 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료되며, PCR을 임상에 이용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다고 생각한다.

요 약

연구배경 : 결핵성 홍막 삼출은 아직까지도 우리나라에서 가장 흔한 홍막 삼출의 원인으로 생각되고 있으나, 조직학적 진단 방법을 포함한 기존의 진단 방법으로도 약 70%에서만 확진이 가능하다. 특히 고연령층이나 면역이 억제된 환자등에서 기존의 진단 방법으로 진단되지 않고, 여러가지 시험 치료에 반응하지 않는 홍막 삼출의 경우에는 임상적으로 어려움을 겪게 되며, 보다 예민한 진단 방법의 개발을 위해 여러 분야의 노력이 있어 왔다. PCR은 어느 특정한 DNA를 연속적으로 복제할 수 있어 검체내에 극미량으로 존재하고 있는 병원체의 진단에 이용되고 있으며, 결핵성 홍막염의 진단에도 도움을 줄것으로 기대되었다. 이에 저자들은 PCR을 이용한 결핵성 홍막염 진단의 유용성을 평가해 보고자 본 연구를 시행하였다.

방법 : 양성 및 음성 대조군으로 배양된 결핵균주 및 비결핵성 *Mycobacterium* 균주를 사용하였고 연구 대상은 홍막 삼출 환자 53명이었다. 이중 결핵성 홍막염이 확진된 환자가 20명, 결핵성 홍막 삼출이 배제된 환자가 20명, 결핵이 확진되지 않았으나 임상적으로 결핵으로 의심하여 항결핵제제를 투여한 후 호전된 환자가 10명이었고, 항결핵제제 투여후에도 호전되지 않았으며 반복적인 진단 과정에서 결핵이 배제된 환자가 3명이었다. 대상 환자는 홍막 생검 및 흉수의 ADA 활성도를 포함한 기존의 진단 방법과 PCR을 시행하였다. PCR의 target은 *Mycobacterium tuberculosis*의 특이성을 갖으며 한 개체내에 여러번 반복하여 존재한다고 알려져 있는 DNA인, IS6110 gene의 일부인 123 base pair DNA로 하였고, 그 결과를 기존의 진단 결과와 비교하였다.

결과 :

- 1) 배양한 결핵균 및 비결핵성 *Mycobacterium*을 이용한 PCR의 감수성은 DNA 1 fg까지였고, *Mycobacterium tuberculosis*와 *Mycobacterium bovis*에만 특이적이었다.
- 2) 확진된 홍막액을 이용한 PCR의 감수성은 80.0%

(16/20)였고, 특이성은 95.0%(19/20)였다.

3) 결핵이 확진되지 않았으나 임상적으로 결핵으로 의심하여 항결핵제제를 투여한 후 호전된 환자중 60.0%에서 PCR 양성을 나타내었다.

4) 결핵이 확진되지 않았으나 임상적으로 결핵으로 의심하여 항결핵제제를 투여한 환자중 호전되지 않고 추후 결핵이 배제된 환자 3명 모두에서 PCR 음성을 나타내었다.

5) 흉막액의 ADA 활성도는 확진된 결핵성 흉막염 환자군과 임상적으로 결핵이 의심되어 항결핵제 투여후 호전된 군이 여타군보다 유의하게 높았고, PCR 결과와 좋은 상관 관계를 보였다.

결론 : PCR은 결핵성 흉막염의 진단에 매우 예민하고 특이적이었으며, ADA와의 좋은 상관 관계를 보였다. 따라서 PCR을 이용한 진단 방법을 추가함으로써 결핵성 흉막염의 진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료되었다.

REFERENCES

- 1) Maartens G, Bateman ED: Tuberculous pleural effusions: increased culture yield with bedside inoculation of pleural fluid and poor diagnostic value of adenosine deaminase. *Thorax* 46:96, 1991
- 2) Saiki RK, Genfand DH, Stoffel SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487, 1988
- 3) Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 4:1069, 1989
- 4) 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, 1989
- 5) Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, Aditi B, Seth P, Shrinivas: Identification of Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction. *Lancet* 17(335):423, 1990
- 6) 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, 1990
- 7) Hermans PW, Schuitema AR, Soolingen DV, Verstynen CP, Bik EM, Thole JR, Kolk AH, Embden JD: Specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 28:1204, 1990
- 8) Hermans PW, Soolingen DV, Dale JW, Schuitema AR, Mcadam RA, Catty D, Embden JD: Insertion element IS986 from Mycobacterium tuberculosis: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28:2437, 1990
- 9) DeWit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M: Direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 28:2437, 1990
- 10) Eisenach KD, Siffford MD, Cave D, Bates JH, Crawford JT: Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 144:1160, 1991
- 11) Eisenach KD, Cave D, Bates JH, Crawford JT: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 161:977, 1990
- 12) Patel RJ, Freis JW, Piessens WF, 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, 1990
- 13) Thierry D, Brisson-Noel A, 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, 1990
- 14) Walker DA, Taylor IK, Mitchell DM, Shaw RJ: Comparison of polymerase chain reaction amplification of two mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 65kDa antigen gene, in the diagnosis of tuberculosis. *Thorax* 47:690, 1992
- 15) Lassence A, Lecossier D, Pierre C, Cadranel J, Stern M, Hance AJ: Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction: comparison of two protocols. *Thorax* 47:265, 1992
- 16) 김호중, 김영환, 한성규, 심영수, 김건열, 한용철: Polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 결핵의 진단에 관한 연구. *결핵 및 호흡기 질환* 39:517, 1992
- 17) 윤경한, 조상래, 이미경, 정동현, 김주덕, 천선희, 장준, 김성규, 이원형, 조철호: 결핵의 진단을 위한 중합효소연쇄반응의 평가. 제 73 차 대한결핵 및 호흡기

학회추계 학술대회 초록집 56, 1991

- 18) Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, Pialowx G, Gicquel B, Garrigue G: Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 338:364, 1991
- 19) Sjobring U, Mecklenburg M, Anderson AB, Miörner H: Polymerase Chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 28: 2200, 1990
- 20) Darby GK, Jones AS, Kennedy JF, Walker RT: Isolation and analysis of the nucleic acid and polysaccharides from *Clostridium welchii*. *J Bacteriol* 103:159, 1970
- 21) Hurley SS, Splitter GA, Welch RA: Rapid lysis technique for *Mycobacterial* species. *J Clin Microbiol* 25:2227, 1987
- 22) Giusti G: Adenosine deaminase, In Bergmeyer HU (Ed.) *Method of enzymatic analysis*, Vol 2, p 1092, New York, Academic Press, 1974
- 23) 성낙억, 신계철, 이홍재, 이경원 : 각종 늑막저류에서 adenosine deaminase 활성도에 관한 연구. *대한내과 학회잡지* 33:240, 1986
- 24) 장상호, 장 준, 손희영, 김성규, 김기호 : 흉막액 adenosine deaminase 활성도의 진단적 가치에 관한 연구. *대한내과학회잡지* 31:214, 1986
- 25) Bocart D, Lecossier D, Lassence AD, Valeyre D, Battesti J, Hance AJ: A search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 145:1142, 1992
- 26) 모은경, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철, 유철규 : Adenosine deaminase의 진단적 가치에 관한 전향적 연구. *결핵 및 호흡기 질환* 39:596, 1992
- 27) Fidler H, Rook GAW, Johnson NM, McFadden JJ: Search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am Respir Dis* 147:777, 1993