

□ 원 저 □

객담 도말 음성인 환자에서 기관지폐포 세척액 결핵균 중합 효소 연쇄반응 검사의 유용성

한림대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리학교실*

모은경, 경태영, 김동규, 박명재, 이명구, 현인규, 정기석, 이경화*

= Abstract =

The Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction in the Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Detection of Mycobacteria

Eun Kyung Mo, MD., Tae Young Kyung, MD., Dong Gyu Kim, MD., Myung Jae Park, MD.,
Myung Goo Lee, MD., In Gyu Hyun, MD., Ki-Suck Jung, MD., Kyung Wha Lee, MD.*

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

Background : Diagnosis of pulmonary tuberculosis is not easy when the sputum smear for *Mycobacterium tuberculosis*(M. Tb) is negative. We evaluated the clinical utility of polymerase chain reaction(PCR) for detecting M. Tb in bronchoalveolar lavage(BAL) samples.

Methods : We recruited 84 patients whose sputum smear for M. Tb were negative or not available due to no production of sputum. We performed bronchoalveolar lavage for acid-fast stain, culture of mycobacteria, and PCR assay of BAL fluid. We analyzed the results of microbiologic examination.

Results : The sensitivity of BAL fluid smear, culture, and PCR were 20%, 38%, and 40%, respectively. The specificity of BAL fluid PCR was 95%. The positive predictive value of PCR was 89%. The smear of BAL fluid was positive in 17%. The PCR of BAL fluid was the only diagnostic test in 17%. Therefore, the BAL fluid analysis including smear and PCR was diagnostic in 34% within 24 hours. The BAL fluid analysis including smear, PCR, and culture was diagnostic in 55% within 2 month.

Conclusion : The BAL fluid PCR was valuable method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients whose sputa were not available or reveal negative smear. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 46 : 519-528)

Key words : Tuberculosis, Bronchoalveolar lavage, Polymerase chain reaction

서 론

결핵의 확진은 결핵균이 발견된 이래로 근 100년 동

안 환자의 분비물이나 조직에서 항산균도말 검사와 배양으로 결핵균을 발견하는 것에 의존하고 있다. 그러나 결핵균은 대개 소량으로 존재하기 때문에 병이 진

행된 상태에서만 균이 검출되는 경우가 많고 경중의 폐결핵과 폐외결핵 및 소아 환자의 검체를 채취하는 데는 어려움이 있다. 배양검사로 결핵균을 확진하는 데는 6-10주의 시간이 소요되고 민감도(sensitivity)는 50% 내외로 알려져 있다²⁾. 따라서 기존의 방법보다 빠르고 정확한 진단법의 개발의 필요성은 과거부터 인지되어 왔으며 최근에 후천성 면역 결핍증 환자에서 결핵의 이환율이 급증함에 따라 더욱 절실하게 되었다. 따라서 면역학적 진단법과 분자생물학적 방법을 이용한 결핵의 진단법에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다³⁾.

이중 증합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)은 1985년 Saiki 등에 의해 개발된 것으로 고열에서도 분해되지 않는 DNA 증합효소를 이용해서 원하는 부분의 DNA 분절을 수 시간 내에 증폭시킬 수 있는 방법으로⁴⁾ 이를 이용하면 균의 확인이 가능하며 다양한 검체에서 결핵균을 확인할 수 있다. 그러나 PCR이 초기에 기대했던 만큼 민감도가 높지 않고, PCR 억제인자의 존재, carry-over에 의한 오염 등의 문제로 인하여 널리 이용되지 못하였다. 따라서 PCR이 지닌 문제점을 개선하려는 노력이 이루어지고 있다.

PCR자체의 민감도와 특이도(specificity)를 높이는 시도와 함께 고려되어야 할 것은 임상에서 실제로 환자에 적용하여 결핵을 진단하고 치료할 때는 PCR 결과만으로 결론을 내릴 것이 아니라 환자의 임상상, 흉부 방사선 사진, 결핵균의 도말검사 등을 모두 종합한 임상 전문가의 최종 판단이 이루어져야 한다⁵⁾. 그러나 이제까지의 연구 결과는 대부분 결핵환자에서 PCR과 결핵균의 도말, 배양검사 혹은 조직 검사결과를 단순 비교하는 것이었고 대개는 결핵균이 다량 포함된 검체에서 PCR 결과를 비교하는 것이었다. 그 결과 PCR이 지닌 고유의 문제점으로 인해 PCR의 유용성이 평가절하되기도 하였으며 임상적인 맥락에서 PCR을 환자의 진단과 치료에 이용함에 있어서 유용성을 평가하는 것이 중요하다고 생각된다. 따라서 연구자들은 다른 여러 가지 진단방법으로 결핵을 진단

할 수 없는 경우 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에 대한 nested PCR을 시행하여 결핵의 진단에 있어서 유용성을 알아보고자 하였다.

방 법

1. 대상환자

한림대학교 의료원에 내원하는 환자로 폐병변의 진단적 검사를 위하여 기관지내시경을 시행한 환자중 결핵균 PCR 검사가 이루어진 환자를 대상으로 하였다. 이중 객담의 결핵균 도말검사상 양성으로 판정되어 객담검사만으로도 진단이 가능한 환자는 제외하였고 단순흉부사진상 활동성 폐결핵이 의심되고 기침, 객담, 발열, 발한, 체중감소 등 폐결핵의 발병을 시사할 만한 증상이 있으나 객담의 항산균 도말 검사를 3회까지 시행하여도 항산균이 검출되지 않는 환자 혹은 객담의 배출이 불가능한 환자를 대상으로 하였다.

기관지폐포 세척술(Bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하여 세척액으로 결핵균 도말과 배양, PCR검사를 시행하였다. 기관지폐포 세척술은 110내지 150ml의 생리 식염수를 병변이 있는 분절 기관지에 4회 걸쳐 주입과 배액을 반복하여 시행하였다.

2. 임상 검체의 처리

PCR을 위하여 객담의 결핵균 DNA를 분리하는 방법은 다음과 같다. 객담 500 μ l 에 hydrolysis buffer 50 μ l 을 가하여 액화시키고 이중 200 μ l 을 취하여 6,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 침전물을 500 μ l 의 washing solution에 부유시킨 후 다시 6,000rpm에서 2분간 원심분리하였다. 이 과정을 2회 반복하였다. 상층액은 버리고 침전물을 50 μ l 의 1x lysis buffer에 부유시킨 다음 mineral oil을 한 방울 떨어뜨렸다. 튜브를 microwave oven에 넣고 5분간 처리한 다음 13,000rpm에서 원

심분리한 후 상층액은 버리고 부유시켜서 100 μ l의 hydrolysis buffer를 가해 액화시켰다. 이후 객담의 처리와 동일한 과정으로 처리하여 PCR을 시행하였다.

3. PCR 방법

결핵균의 PCR을 위해 고안된 TB-CR® kit(㈜ 바이오니아)를 사용하였다. 각 tube에는 IS6110의 특정부위를 증폭시키는 1st PCR primer (5'-CTCAAGGAGCACATCAGC, 5'-TCATAGGAGCTTCCGACC)와 nested PCR을 위해서 2nd PCR primer (5'-CTACGGTGTTTACGGTGCCC, 5'-TAGGCGTCGGT GACAAAGGC)가 10pM의 농도로 들어 있고 2.5U taq polymerase와 10mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 40mM KCl, 10mM Tris Hcl (pH 8.3)이 들어 있다. tube에 18 μ l의 8-methoxy-psoralen(8-MOP)용액을 가하고 검체에서 추출한 DNA 2 μ l을 가하고 잘 섞어준 뒤 5초간 원심분리한 후 mineral oil을 가해 PCR을 시행하였다. PCR의 cycle은 94도에서 5분간 predenaturation 후 94도에서 1분, 60도에서 1분, 72도에서 1분씩 30 cycle을 시행하고 nested PCR을 시행하였다. 새 tube에 18 μ l의 8-MOP 용액을 가해 주고 PCR 반응액 2 μ l를 첨가하여 처음 PCR과 같은 조건으로 PCR을 수행한다. PCR이 끝난 후 tube를 UV transilluminator위에 올려놓고 5-10분간 PCR 산물을 불활성화(inactivation)시켜 carry-over로 인한 오염을 방지하였다. PCR용액 10 μ l을 1.2% agarose gel에 분주하여 20분간 전기영동시켰다.

4. 대상환자의 추적관찰

조직검사상 결핵으로 진단되었거나 배양검사에서 결핵균이 검출되었거나 단순 흉부 방사선 검사 및 고해상도 단층촬영상 활동성 폐결핵이 의심되는 경우 iso-

niazid, rifampin, ethambutol, pyrazinamide 등 항결핵제의 투여를 시작하고 환자의 경과를 추적 관찰하였다.

결 과

1. 대상환자의 질환별 분포

대상환자는 모두 84명이었고 이중 남자가 56명, 여자가 28명이었으며 연령은 49 \pm 19세(평균 \pm 표준편차)였다. 이중 2명은 신장이식을 받은 면역억제 환자였으며 면역부전 바이러스 감염환자는 없었다.

대상 환자 84명중 활동성 폐결핵으로 판명된 환자는 모두 40명이었으며 비활동성 폐결핵이 5명이었다. 비결핵성 폐질환자는 39명이었다. 40명의 활동성 폐결핵증 객담의 배양이나 기관지 내시경을 통한 기관지 폐포 세척액의 결핵균 도말 및 배양으로 확진된 폐결핵은 29명이었다. 나머지 11명중 4명은 경피적 폐흡인 및 조직검사 혹은 경기관지 폐생검을 통하여 진단성 괴사가 동반된 육아종이 관찰되어 결핵으로 확진되었고, 7명은 객담검사와 기관지 폐포 세척액의 미생물학적 검사상 모두 음성이었으나 단순 흉부방사선 검사 및 흉부 전산화 단층촬영등에서 임상적으로 결핵이 강력히 의심되어 항결핵제로 치료하였고 3개월이상의 추적관찰을 통하여 폐병변이 서서히 호전됨이 확인되었다. 결핵을 제외한 나머지 환자 39명은, 세균성 폐렴 11명, 폐농양 3명, 폐암 3명, 기관지 확장증 2명, 악성종양의 전이 2명, 간질성 폐 섬유증 2명, 바이러스성 폐렴 1명, 진균증 1명, bronchiolitis obliterans organizing pneumonia 1명, 호산구성 폐렴 1명, 방사선 폐렴 1명, 심부전으로 인한 폐부종 1명, 만성 기관지염 4명, 객혈의 원인진단을 위해 기관지내시경을 시행했으나 원인이 규명되지 않았던 경우 3명, 원인이 밝혀지지 않은채 사망한 환자가 3명이었다.(Table 1)

Table 1. Final diagnosis of patients

Diagnosis	Number of patients	
Active tuberculosis	40	
Inactive tuberculosis	5	
Nontuberculous disease	39	
Bacterial pneumonia	11	Bronchitis 4
Lung abscess	3	Bronchogenic carcinoma 3
Bronchiectasis	2	Interstitial fibrosis 2
Lymphangitic metastasis	2	Viral pneumonia 1
Eosinophilic pneumonia	1	Fungus ball 1
Radiation pneumonitis	1	BOOP 1
Cardiogenic edema	1	Hemotysis 3
Idiopathic	3	

Boop : Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia.

Table 2. Results of sputum study in patients with active pulmonary tuberculosis

Results of sputum exam			No. of patients(n=40)	
smear	culture	PCR	microbiologic TB	clinical TB
-	-	-	11	5
-	+	-	2	0
-	-	+	1	2
-	+	+	8	0
not done			7	4
total			29	11

TB : tuberculosis, PCR : polymerase chain reaction

2. 검사성적

1) 객담 도말 음성 환자에서 객담 배양 및 PCR 검사 결과

각각의 검사는 객담 도말 검사가 62례, 객담 배양 검사 45례, 객담 PCR 검사 50례, 기관지 폐포 세척액 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)를 이용한 도말 검사 78례, 배양 70례, PCR 84례에서 시행되었다.

객담 도말 검사상 음성을 보인 활동성 폐결핵 환자에서 시행된 배양검사는 모두 21건이었는데 10명에

서 양성을 보여 민감도 48%를 보였고 객담 PCR 검사는 24례에서 시행되었는데 이중 11명에서 양성을 보여 민감도는 46%였다. 객담 도말과 배양 음성일 때 객담 PCR이 양성되었던 경우는 8명중 6명(75%)이었다. 객담 배양에 대한 PCR의 민감도는 80%로 객담 배양에서 양성을 보인 환자는 모두 10명이었고 이중 PCR은 8명에서 양성이었다. PCR 양성일 때 객담 배양 양성에 대한 예측치는 73%로 PCR 양성 11명중 배양이 양성되었던 경우는 8명이었다. 배양 결과에 상관없이 객담 PCR 양성시 결핵에 대한 예측치는 100%로 위양성은 없었다.(Table 2)

Table 3. Results of bronchoalveolar lavage fluid(BALF) in patients with active pulmonary tuberculosis

BALF	smear	culture	PCR	No. of patients(n=40)	
				sputum PCR(-)	sputum PCR(+)
	+	-	+	1	1
	+	+	-	2	0
	+	+	+	2	2
	-	+	-	6	0
	-	+	+	2	1
	-	-	+	3	4
	-	-	-	13	3
	total			29	11

2) 객담 도말 음성 환자에서 BALF 검사 결과

BAL을 통한 도말 검사는 민감도 20%로 40명중 8명에서 양성을 나타냈고 배양 검사 민감도는 38%로 40명중 15명이 양성이었다. BALF PCR의 경우 민감도는 40%로 40명중 16명에서 양성되었고 특이도는 95%로 2명에서 위양성이 있었다. BALF PCR 양성일 때 결핵에 대한 예측치는 89%였다.(Table 3) BALF에서 배양 양성일 때 PCR이 양성인 경우는 15명중 7명으로 47%였고 BALF 배양 음성시 PCR 양성인 경우는 25명중 9명으로 36%였다.

폐결핵 환자 40명중 기관지폐포 세척액 도말 검사에서 양성을 보여 진단이 가능했던 환자는 8명(36명에서 시행됨)이었다. 도말검사는 음성이나 배양에서 양성으로 나온 경우는 9명이었는데 이중 PCR이 양성으로 나왔던 환자는 3명이었다. 배양 결과와는 무관하게 도말 음성, PCR 양성인 경우는 10명으로 이 환자들이 기관지내시경 PCR 검사로만 진단된 환자들이 되겠다. 이중 7명에서는 기관지폐포 세척액 PCR에서만 양성으로 나타났고 3명에서는 기관지폐포 세척액 PCR에서 양성되었고 배양검사에서도 양성이었다. 따라서 기관지내시경을 이용한 BALF의 도말(8명) 및 PCR(10명)을 통해 40례중 18례(45%)에서 양성을 보여 조기 진단의 중요한 근거로 이용될 수 있었다. 배양 양성까지 더하면 모두 40례중 24례(60

%)에서 기관지폐포 세척액 검사로 진단이 가능하였다.(Fig. 1)

기관지폐포 세척액의 도말이 양성인데 PCR이 음성인 경우가 2례에서 있었고 BALF의 배양 검사상 양성인데 PCR이 음성인 경우는 8례가 있었다. 객담 PCR 검사와 비교해 볼때 객담 PCR이 양성인 경우는 모두 11례였고 음성인 경우는 29례였다.(Table 3)

3) 객담 도말 및 PCR 음성 환자에서 BALF 검사 결과

객담 도말 및 PCR이 음성이었던 29명중 BALF 도말검사는 5명에서 양성되었고 배양검사는 12명에서 양성을 보였고 PCR은 8명에서 양성을 보였다. 따라서 객담 검사가 PCR까지 포함하여 모두 음성일 때 BALF 도말로 진단한 경우가 29명중 5명(17%)이었고 도말도 음성으로 나와 PCR로 진단한 경우가 5명(17%) 이었다. 배양검사는 2개월이 지나기전에는 진단에 도움이 되지 않으므로 결국 BAL을 시행하여 조기에 진단이 된 경우는 29명중 10명이 된다. 배양만 양성으로 나온 6례를 더하면 29명중 16명(55%)에서 기관지폐포 세척액 검사로 진단이 되었다.

배양검사는 검사 결과가 나올 때까지 장시간이 소요되기 때문에 조기 진단에 도움을 주지 못한다는 전체

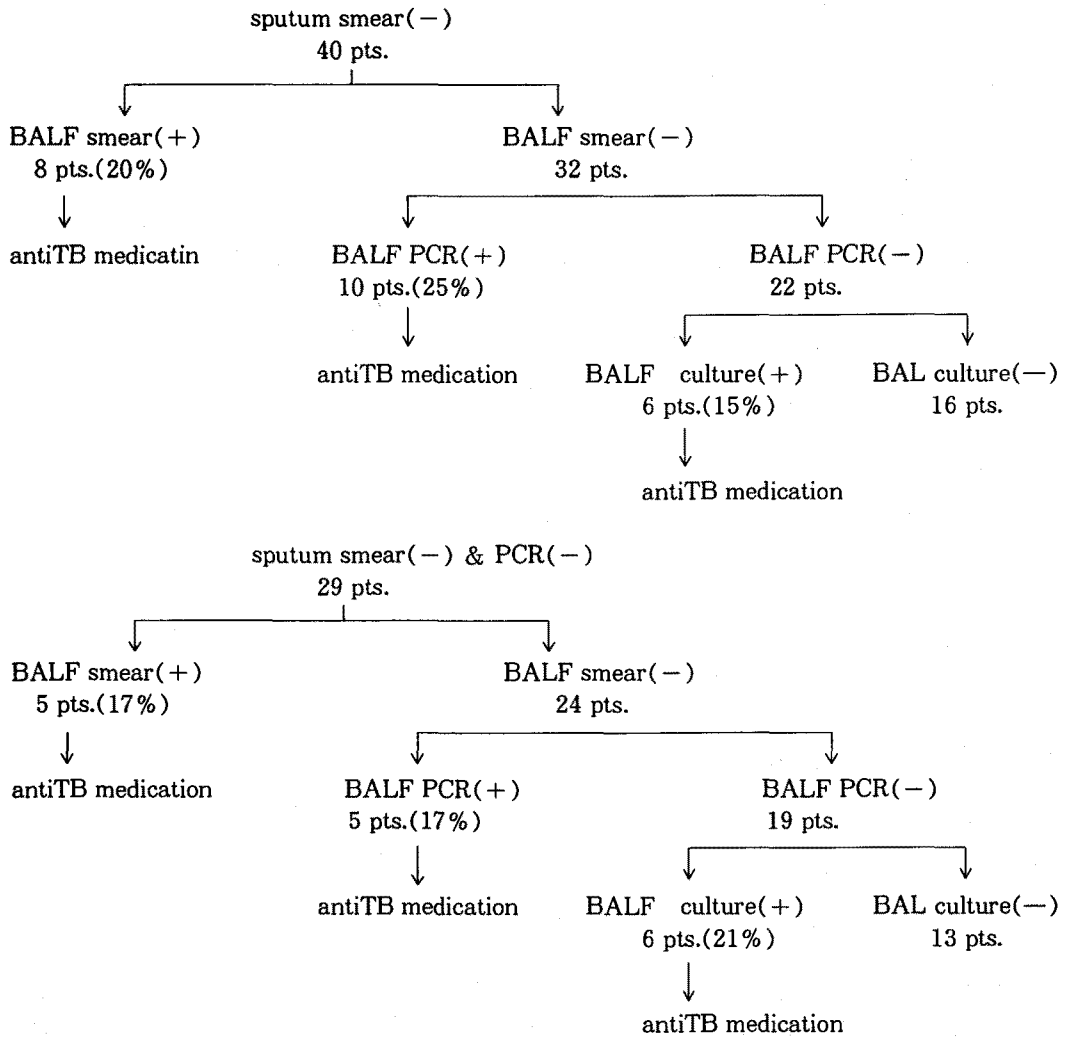


Fig. 1. The results of bronchoalveolar lavage fluid(BALF) examinations in patients with sputum AFB smear-negative active pulmonary tuberculosis.

하에 배양검사 결과는 고려하지 않고 객담 PCR로 진단이 가능했던 경우는 40명중 11명이었고 BALF 검사중 PCR만 양성이었던 경우는 40명중 10명이었고 이중 객담 PCR도 음성이었던 경우는 5명으로 객담 혹은 BAL PCR로만 진단이 가능했던 환자는 모두 16명이었다.

대상환자 84명중 39명은 결핵이 아닌 환자로 이들 환자에서 기관지 폐포세척액의 항산균 도말 검사와 배

양검사, PCR 검사를 시행하여 PCR의 위양성율을 알아보고자 하였다. 그 결과 2명에서 양성으로 나타났는데 1례는 폐암에 대한 항암 화학 요법 및 방사선 치료 후 발생한 폐 침윤으로 기관지내시경을 시행하였고 호흡부전으로 사망하였는데 부검이 시행되지 않아 정확한 원인이 밝혀지지 않았다. 1례는 객혈환자로 3개월까지 외래로 추적되었다가 중단 되었다. 비활동성 폐결핵에서는 5명 모두 PCR이 음성으로 나타났다.

고 안

결핵의 진단에 있어서 PCR을 임상에 적용해 보고자 하는 노력이 여러 연구자들에 의해 이루어져 왔다⁶⁻⁸⁾. 그러나 보고자마다 또한 연구실마다 검사 성적에 매우 커다란 차이를 보이고 있어 민감도는 55%에서 100%까지, 특이도는 72%에서 100%까지 보고되고 있다⁹⁻¹³⁾. 따라서 초기에 기대했던 만큼 이용되지 못하고 있으며 PCR의 비용을 고려하면 도말, 배양 검사보다 나은 것이 없다는 견해도 있다. 그러나 면역 억제환자가 증가하면서 균수의 배출이 적고 임상양상이 비전형적인 결핵환자가 점차 증가함에 따라 민감도가 높은 검사의 필요성이 커지고 있다.

PCR을 임상에서 이용하기 위해서는 민감도와 특이도가 향상되어야 한다. 이를 위하여 여러 가지 방법이 고안되었는데 특히 nested PCR은 PCR의 산물을 다시 증폭시켜 처음에 목표로 사용한 DNA sequence의 안쪽 sequence를 목표로 더 작은 표식자(probe)를 만들어 다시 중합효소 연쇄 반응을 시행함으로써 민감도와 특이도를 높일 수 있는 방법이다^{14,15)}. PCR을 이용하여 결핵균을 진단하는데 또 다른 문제점은 결핵균 양성의 검체에서 음성의 검체로 DNA가 전파되어(Carry-over) 오염된 DNA가 증폭된 결과로 생기는 위양성이 많다는 것이다. 결핵균의 DNA가 전파되는 주된 경로는 임상검체 혹은 PCR의 산물을 다룰 때 생기는 에어로졸 때문이다. 위양성을 줄이기 위해 증폭 전 단계와 증폭 후 과정을 분리하여 시도하고, 실험에 쓰이는 기구들을 일회용으로 사용하거나 미리 분주된 시약을 사용하는 등 여러 가지 방법이 고안되었으나 역시 위양성을 그다지 줄일 수 없었다¹⁶⁾. 최근에는 PCR 산물을 더 이상 증폭되지 않게 불활성화시키는 방법이 개발되었는데 이는 PCR 산물을 광화학적(photochemical), 효소적(enzymatic), 화학적(chemical)으로 핵산을 변형시켜 PCR의 template로 작용하지 못하도록 하는 것이다^{17,18)}.

PCR의 여러 가지 문제점을 개선하고 PCR을 좀더 쉽게 수행하기 위해 상업적으로 개발된 키트가 등장하

었는데 이로 인해 PCR이 좀더 용이해지고 위음성도 줄일 수 있었다. 이중 Amplicor®를 이용한 결핵균 검출에 대한 PCR의 성적이 국외 논문에 발표된 바 있다. 이를 살펴보면 항산균 도말 양성인 객담 검체에서 95% 이상의 민감도와 특이도를 보이는 반면 항산균 도말 음성, 배양 양성의 검체에서 민감도는 40 내지 77%이고 특이도는 95% 이상으로 보고되고 있다. 그러나 이제까지의 결과는 대부분 도말 양성 혹은 배양 양성의 환자에서 PCR의 유용성을 알아본 것이어서 실제 임상에서 적용이 가능할 지에 대해서는 알려진 바가 거의 없고 외국 논문의 경우 후천성 면역결핍증 환자가 대상 환자의 반 이상을 차지하고 있고 비정형 마이코박테리아에 의한 감염율이 상대적으로 높아서 우리나라 실정에 그대로 적용하기에는 문제점이 있다.

결핵이 의심되는 환자에서 객담 항산균 도말이 양성이라면 의사는 항결핵제를 시작할 것이다. 그러나 음성인 경우에는 환자의 임상상이나 흉부 방사선 소견등을 종합하여 항결핵제 치료에 대한 결정을 하고 1달 혹은 2달간의 추적 관찰을 통하여 호전이 되는지를 관찰하게 되고 배양결과를 알 수 있게 된다. 그러나 결핵균이 도말검사 및 배양검사에서도 증명되지 않는 경우가 많고 특히 면역부전 바이러스 감염의 경우를 제외한 면역억제 환자의 경우는 균수가 적어 검출이 어렵다. 또한 우리나라와 같이 결핵의 유병율이 높은 지역에서는 결핵이 의심되는 폐병변이 있을 때 결핵균이 증명되지 않은 상태라도 항결핵제 치료를 하는 경우가 흔하다. 이러한 경우 항 결핵제로 인한 부작용, 비교적 장기간이 소요되는 결핵 치료로 인한 시간적, 경제적 손실 또한 무시할 수 없으며 근자에는 폐암을 비롯한 결핵이외의 호흡기 질환이 증가하고 있어 결핵이 아닌 경우 치료시기를 놓칠 수 있는 심각한 결과를 초래하기도 한다. 또한 결핵의 진단이 늦어짐으로 인해 결핵이 전염되는 결과를 가져올 수도 있다. 임상자들은 가능하면 결핵균을 증명하기 위해 객담 도말검사가 음성이거나 객담의 채취가 어려운 경우에 기관지내시경을 시행하여 기관지세척액 혹은 기관지폐포 세척

액의 항산균 도말 및 배양검사를 시행해왔다. 객담 도말검사 음성인 환자에서 기관지폐포 세척술의 항산균 도말검사는 14-68%의 양성율을 보이고 배양검사는 90% 이상의 양성율을 보인다고 알려져 있다¹⁹⁻²²⁾. 따라서 기관지폐포 세척액 PCR을 같이 이용하여 결핵의 진단율을 더 높일 수 있는지 알아보고자 하였다.

본 연구에서 사용된 PCR 키트는 DNA 전파에 의한 오염을 줄이고자 광화학적 불활성화 방법을 택하고 있으며 DNA, 8-MOP을 제외한 모든 시료를 미리 분주해 놓음으로써 튜브를 자주 개폐시키거나 피펫팅을 반복하는 횟수를 줄여 위음성을 최대한 줄이고자 하는데 역점을 두었으며 따라서 위양성율이 2.4%에 불과하였으나 민감도는 다른 연구에 비해 떨어졌었다⁹⁻¹³⁾. 그러나 그럼에도 불구하고 PCR의 진단율이 배양과 거의 같았으며 객담 혹은 BAL PCR로만 진단이 가능했던 경우도 40명중 16명에 달했다. 도말검사와 PCR 결과를 비교해 볼 필요가 있는데 이는 배양은 8주 내지 12주가 있어야 결과가 나오므로 당장에 치료를 결정하는데 이용할 수가 없기 때문이다. BALF 도말 검사의 경우 40명중 9명이 양성으로 민감도는 23%, 양성 예측치는 100%였다. 도말 음성, PCR 양성의 결과만을 가지고 결핵으로 진단하였을 때 결핵에 대한 민감도는 30% (40명중 12명이 양성), 양성 예측치는 86% (12/14)로 양성율이 도말보다 높았다. 객담 혹은 BALF PCR이 양성인데 배양검사상 음성을 나타낸 경우도 있었는데 이는 PCR은 사균도 양성으로 나올 수 있는데 반해 배양은 그렇지 않으므로 치료를 시작한 후에 검체 채취를 한 경우에 이와 같은 결과가 나온 경우도 있지만 본 연구에서는 같은 검체를 가지고 도말, 배양 및 PCR을 시행한 것이 아니고 객담의 경우 다른 날에 각각 채취된 것이라 적절한 객담이 채취되지 못한 경우도 있고 기관지폐포 세척액의 경우에도 4개의 튜브에 채취된 검체를 각기 검사하였으므로 서로 상충되는 결과가 나올 수 있었던 것으로 사료된다. BALF 도말의 민감도는 20% (8/40명)였고 PCR의 민감도는 40% (16/40)로 객담 검사의 민감도와 거의 유사하였다. 기관지내시경

을 이용한 결핵균 도말 및 PCR 검사만으로 40례중 18례(45%)에서 조기에 추가 진단이 가능하였으며 이들 중 10례(25%)는 특히 BALF PCR로만 진단이 가능하였다. 객담 검사가 PCR까지 포함하여 모두 음성일 때는 BALF 도말로 진단한 경우가 29명중 5명(17%)이었고 도말도 음성으로 나와 PCR로 진단한 경우가 5명(17%)이었다. 배양검사는 2개월이 지나야 그 결과를 알 수 있으므로 결국 BAL을 시행하여 진단이 된 경우는 역시 29명중 10명이 된다. 따라서 기관지 내시경을 시행함으로써 55%에서 진단이 가능하였고 이중 BAL PCR로만 진단된 경우는 5명으로 12.5%에서 진단이 가능하였다. 양성률만을 가지고 볼 때는 배양 양성인 40명 중 15명이고 PCR 양성인 40명중 16명으로 배양에 비해 민감도가 더 높지는 않으나 빠른 시간 내에 결과를 알 수 있었다. 본 연구에서는 PCR의 위양성을 줄이고 PCR의 질 향상을 감시하고자 결핵이 아닌 다수의 환자에서 PCR을 검사하였고 그 결과 위양성율은 매우 낮음을 알 수 있었다. 따라서 BALF PCR 검사를 시행하는 것이 비용과 이득을 따져볼 때 반드시 시행해야 하는 검사라고 결론을 내리기는 어려우나 임상적 상황에 따라 적절히 이용된다면 과거와는 달리 검사비용이 비교적 저렴한 검사로 결핵의 진단율을 높이고 수 시간 내에 빠른 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 면역억제 환자의 경우는 치료가 늦어지면 생명이 위험한 경우가 많아 특히 PCR이 유용한 검사가 될 것으로 생각된다. 본 연구의 문제점으로 생각되는 것은 객담이 나오지 않는 환자들을 대상으로 하였으나 고장 식염수를 이용한 유도객담에 대한 검사는 이루어지지 않아 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

PCR이 지닌 고유의 문제점으로 인해 PCR의 유용성이 평가절하되기도 하였으나 임상적인 맥락에서 PCR을 환자의 진단과 치료에 이용함에 있어 그 유용성을

평가하는 것이 매우 중요하다고 생각된다. 따라서 저자들은 객담 항산균검사로 폐결핵의 진단이 어려울 때 기관지폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에 대한 nested PCR을 시행하여 결핵의 진단에서의 유용성을 알아보고자 하였다.

방 법 :

단순 흉부사진상 활동성 폐결핵이 의심되나 항산균이 검출되지 않는 환자 혹은 객담의 배출이 불가능한 환자를 대상으로 기관지폐포 세척술(Bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하여 세척액으로 결핵균 도말과 배양, PCR검사를 시행하고 그 결과를 비교하였다.

결 과 :

BALF 도말 검사 민감도는 20% 배양 검사 민감도는 38%, BALF PCR의 민감도는 40%, 특이도는 95%였다. BALF에서 배양 양성일 때 PCR이 양성인 경우는 47%였고 BALF 배양 음성시 PCR 양성인 경우는 36%였다. BALF PCR 양성일 때 결핵에 대한 예측치는 89%였다.

기관지내시경을 이용한 결핵균 도말 및 PCR 검사로 40례중 18례(45%)에서 조기에 추가 진단이 가능하였으며 이들 중 8례는 도말로 진단이 되었고 10례(25%)는 BALF PCR로만 진단이 가능하였다. 객담 검사가 PCR까지 포함하여 모두 음성일 때 BALF 도말로 진단한 경우가 29명중 5명(17%)이었고 도말도 음성으로 나와 PCR로 진단한 경우가 5명(17%) 이었다. 배양검사는 2개월이 지나야 결과를 알 수 있으므로 BAL을 시행하여 조기 진단이 된 경우는 29명중 10명이 된다. BAL PCR로만 진단된 경우는 5명으로 12.5%에서 진단이 가능하였다.

결 론 :

PCR은 과거와는 달리 검사비용이 비교적 저렴한 검사로 결핵의 진단율을 높이고 수일내에 빠른 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. BALF PCR 검사를 시행하는 것이 비용과 이득을 따져볼 때 반드시 시행해야 하는 검사라고 결론을 내리기는 어려우나 임상적 상황에 따라 적절히 이용된다면 결핵의 진단율을 높이

고 수시간 내에 빠른 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 면역억제 환자의 경우는 치료가 늦어지면 생명이 위험한 경우가 많아 특히 PCR이 유용한 검사가 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Krasnow I, Wayne IG : Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. *Appl Microbiol* 18 : 915-917, 1969
2. Hong Kong Chest Service/tuberculosis research center, Madras/British medical research council : A study of the characteristics and course of sputum smear-negative pulmonary tuberculosis. *Tubercle* 62 : 155-167, 1981
3. 심영수 : 결핵의 진단. *Med postgr* 21 : 312, 1993
4. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N : Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology* 24 : 476, 1992
5. Chin DP, Yaiko DM, Hadley WK, Sanders CA, Nassos PS, Madej JJ, Hopewell PC : Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 151 : 1872, 1995
6. 김호중, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철 : Polymerase chain reaction을 이용한 결핵의 진단에 관한 연구, 결핵 및 호흡기 질환 39 : 525, 1992
7. 김호중, 현인규, 이명규, 정기석, 안혜경 : 경부 임파절에서 Polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 결핵균의 진단에 관한 연구. 결핵 및 호흡기 질환 42 : 35, 1995
8. Querol JM, Faarga MA, Granda D, Gimeno C,

- Garcia-de-Lomas J : The utility of polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 107 : 1631, 1995
9. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon J, Gicquel B : Characterization of a mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS 6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 28 : 2668, 1990
 10. Kox LF, Rhienthong D, Medo Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, Van Leeuwen J, Van Hensden S, Kuijper S, Kolk AH : A more reliable PCR for detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples. *J Clin Microbiol* 32 : 672, 1994
 11. Kent PT, Kubica R : Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Atlanta : Centers for disease control. 1985
 12. Schulger WN, Rom WN : Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149 : 264, 1994
 13. Richekdi L, Barnini S, Saltini C : Molecular diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 8 suppl : 689s, 1995
 14. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ : Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252 : 1643, 1991
 15. Li H, Gyllensten UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N : Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335 : 414, 1988
 16. Kwok S, Higuchi R : Avoiding false positive with PCR. *Nature* 339 : 237, 1989
 17. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL : Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination of polymerase chain reactions. *Gene* 93 : 125, 1990
 18. Chimino GD, Metchette KC, Tessman JW, Hearst JE, Issacs ST : Post PCR sterilization : a method to control carry-over contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 19 : 99-107, 1991
 19. De Gracia J, Curull V, Vidal R, Riba A, Orriols R, Martin N, Morell F : Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in suspected pulmonary tuberculosis. *Chest* 93 : 329, 1988
 20. Jett JR, Cortese DA, Dines ED : The value of bronchoscopy in the diagnosis of mycobacterial disease. *Chest* 80 : 575, 1981
 21. Bauhman RP, Dohn MN, Loudon RG, Frame PT : Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage in tuberculosis and fungal infections. *Chest* 99 : 92, 1991
 22. Chan HS, Sun AJM, Gerhard BH : Bronchoscopic aspiration and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of sputum smear-negative pulmonary tuberculosis. *Lung* 168 : 215, 1990