
결핵성 림프절염의 진단을 위한 세침흡인 세포검사 및 종합효소연쇄 반응과 효소면역법을 이용한 *Mycobacterium tuberculosis*의 검출

을지대학교 의과대학 병리학교실

김 주 현 · 김 남 훈 · 강 동 욱 · 박 미 자 · 문 상 경 · 유 태 조 · 장 은 주

= Abstract =

Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Fine Needle Aspiration Cytology for the Diagnosis of Tuberculous Lymphadenitis

Joo Heon Kim, M.D., Nam Hoon Kim, M.D., Dong Wook Kang, M.D., Mee Ja Park, M.D., Sang Kyoung Moon, M.D., Tae Cho Yu, M.D. and Eun Ju Jang, M.D.

Department of Pathology, Eulji University School of Medicine, Daejeon, Korea

Tuberculous lymphadenitis is not uncommon in Korea. Therefore, an inexpensive, safe and rapid method is needed to diagnose the tuberculous lymphadenitis. Fine needle aspiration cytology is a good method for this purpose, but has several limitations in the diagnosis of tuberculous lymphadenitis, especially when the presence of acid-fast bacilli is not proved.

To evaluate the usefulness of the polymerase chain reaction with enzyme immunoassay technique in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in the cervical lymph node aspirates, the authors performed fine needle aspiration cytology and *M. tuberculosis* PCR with enzyme immunoassay for mycobacterial DNA sequences from 15 cases of the fine needle aspirates.

Cytomorphologically, the cases were categorized into three types: predominantly necrotic materials; typical epithelioid cell granulomas with or without giant cells and caseous necrosis; and non-tuberculous lesions, such as reactive lymphadenitis, abscess, metastatic carcinoma and malignant lymphoma. *M. tuberculosis* DNA was found in 8 of 15 cases by PCR with enzyme immunoassay. Negative findings on PCR were achieved in 7 cases, which revealed non-tuberculous lymphadenopathy. In conclusion, we suggest that *M. tuberculosis* PCR with enzyme immunoassay using the fine needle aspirates is a very useful tool for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis.

Key words: Tuberculosis, Fine needle aspiration cytology, Polymerase chain reaction, Lymph node

책임저자 : 김주현

주 소 : (301-070) 대전광역시 중구 목동 산 24-14, 을지대학교 의과대학 병리학교실

전 화 : 042-259-1477

팩 스 : 042-259-1495

E-mail address : kjh2000@emc.eulji.ac.kr

서 론

결핵성 림프절염은 개발도상국에서는 비교적 흔한 질환이다. 따라서 신속한 화학요법을 시행하기 위하여 빠르고 정확하며 경제적이면서도 안전한 진단방법이 필요하다. 전통적으로 결핵성 림프절염의 진단은 병리학적 소견 및 세균배양법에 의존하여 왔으며 최근 세침흡인 세포검사도 이러한 요구를 충족시켜 줄 수 있는 방법중의 하나로 이용되고 있다.^{1,2)} 그러나 결핵성 림프절염은 형태학적으로 육아종성 병변을 보이는 다양한 질환들과의 감별을 필요로 하며 특히 괴사성 물질만을 보이는 경우에는 진단에 어려움을 겪게 된다. 이러한 경우 항산성 세균염색이나 세균배양법을 이용한 결핵균의 증명을 통해서 진단 및 치료에 임하는 것이 중요하기 때문에 진단에 대한 민감도 및 치료시간의 지연을 초래할 수 있다. 이와같이 세침흡인 세포검사 및 세균학적 검사법은 진단에 대한 민감도 및 특이도가 23~90% 내외로 보고자에 따라 다양하므로 이를 보완하기 위한 새로운 방법으로 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction)을 함께 이용할 수 있다.³⁻⁸⁾

본 연구자는 본원에서 시행한 15예의 경부 림프절 세침흡인 세포검사에서의 조직학적 및 임상적으로 진단을 확인한 예의 세포학적 분석 및 효소면역법(enzyme immunoassay)을 결합한 중합효소연쇄반응법의 결과를 토대로 비교분석함으로써 중합효소연쇄반응법의 효용성에 대하여 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

2000년 3월부터 2001년 2월까지 을지의과대학병원 해부병리과에서 시행한 경부 림프절 세침흡인 세포검사에 중 생검 또는 임상적으로 진단의 확인이 가능하였던 15예의 세침흡인 세포검체를 본 연구의 대상으로 하였다. 환자는 총 15명으로 남자 8명, 여자 7명이었으며 나이의 분포는 25~75세이었다. 경부림프절 종대를 주소로 내원한 환자 중 결핵성 림프절염이 의심된 환자를 대상으로 세침흡인 세포검사를 시행하였다. 측정되는 경부 림프절은 대부분 유동성의 무통성 종괴이었고 크기는 1~2 cm으로 다양하였다. 세침흡인 시술방법은 10 ml 주사기에 22~23개이지 굵기

의 주사침을 부착하고 이를 주사기 받침총에 끼워 측정된 림프절내의 서로 다른 부위에서 2~3회 흡인하였으며, 검체중 하나는 유리슬라이드에 도말하여 Papanicolaou 염색과 hematoxylin-esosin(H-E) 염색을 시행하였으며 다른 주사침 내에 있는 흡인검체는 1 ml phosphate buffered saline(PBS)에 혼합하여 중합효소연쇄반응의 검체로 사용하였다.

2. 방법

1) 중합효소연쇄반응

세침흡인된 주사침안의 검체는 1 ml의 PBS로 수세하고 혼합하여 4°C에서 보관되었으며 이를 4% NaOH와 동량 혼합한 후 15분동안 방치한 다음 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 상층액은 제거하였다. 중합효소연쇄반응은 Roche Amplicor M. tuberculosis PCR test kit(Roche PCR Diagnostics, Branchburg, NJ)를 사용하였다.^{9,10)} 침전된 표본 100 μ l에 Washing solution 500 μ l를 넣고 혼합한 후 원심분리한 다음 침전물에 lysis solution 100 μ l를 혼합한 후 60°C에서 40분 동안 반응시켰다. 여기에 neutralization solution 100 μ l를 혼합한 후 중합효소연쇄반응을 통하여 핵산증폭을 하였다. 사용된 올리고뉴클레오타이드 시발체(primer)는 *M. tuberculosis*의 16Sr RNA의 코딩유전자중에서 선택한 시발체쌍 KY18(5'-CACATGCAAGTCGAACGGAAA GG-3'), KY 75(5'-GCCGTATCGCCCGCACGCTCACA-3')가 사용되었으며 시발체의 5'-말단부에는 biotin이 결합되어 있다.

2) 효소면역반응

중합효소연쇄반응을 통하여 얻어진 증폭산물에 denaturation solution 100 μ l를 넣은 후 10분 동안 방치하였다. 이를 hybridization buffer 100 μ l과 함께 *M. tuberculosis* complex에 특이적 올리고뉴클레오타이드 표식자 [KY172-T3(5'-GGTGGAAAGCGCTTTAGCGGT-3')]가 코팅된 마이크로웰 플레이트에 첨가 후 37°C에서 90분동안 반응시킨 다음 수세하였다. 각각의 마이크로웰에 100 μ l의 avidin-horseradish-peroxidase conjugate 및 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine이 포함된 substrate를 첨가하여 발색반응을 시킨 후 450 nm의 파장에서 측정된 흡광계수가 0.35이상인 경우를 양성으로 간주하였다. 하나의 양성 및 음성균을 동시에 비교하였다.

Table 1. Comparison of Polymerase Chain Reaction(PCR) with Enzyme Immunoassay(EIA) Results With Fine Needle Aspiration Cytology(FNAC) and Biopsy.

Age(y)/Sex	PCR	PCR with EIA	FNAC and Biopsy
25/F	+	+	Epithelioid cell granulomas with caseous necrosis
37/M	+	+	Epithelioid cell granulomas with caseous necrosis
57/F	+	+	Epithelioid cell granulomas with caseous necrosis
36/M	-	+	Epithelioid cell granulomas with caseous necrosis
28/F	+	+	Epithelioid cell granulomas with caseous necrosis
27/M	+	+	Epithelioid cell granulomas with caseous necrosis
31/F	+	+	Predominantly necrotic materials
29/M	+	+	Predominantly necrotic materials
73/M	-	-	Reactive lymphadenitis
35/F	-	-	Reactive lymphadenitis
30/F	-	-	Reactive lymphadenitis
27/M	-	-	Reactive lymphadenitis
57/M	-	-	Abscess
75/M	-	-	Metastatic adenocarcinoma
57/F	-	-	Non-Hodgkin's lymphoma

결 과

경부 림프절에 대한 세침흡인 세포검사를 시행한 15예의 환자검체 중 6예가 결핵성 림프절염에 합당한 소견을 보였으며 2예는 결핵성 림프절염이 의심되었고 나머지 7예는 비결핵성 질환의 소견을 보였다 (Table 1). Papanicolaou 염색도말표본에서 결핵성 림프절염에 합당한 소견을 보인 6예는 상피모양의 조직구들로 구성된 육아종성 병변 및 건락성 괴사소를 포함하고 있었다(Fig. 1A). 세침흡인 세포검사 후 시행한 경부 림프절에 대한 조직검사 결과 건락성 괴사소를 동반한 전형적인 만성 육아종성 염증소견을 보여 결핵성 림프절염으로 진단하였다. 이들 6예 모두 중합효소연쇄반응 및 효소면역법에서 양성이었다. Papanicolaou 염색표본에서 급성 염증세포 및 괴사소만 보였던 2예는 결핵성 림프절염을 의심하였으나 외과적 생검조직에서 광범위한 건락성 괴사를 동반한 국소적 육아종성 염증소견이 관찰되었으며 중합효소연쇄반응 및 효소면역법에서 양성반응을 보였다(Fig. 1B). 세포도말표본에서 다양한 림프구 및 대식구로 구성된 반응성 증식의 소견을 보였던 4예는 중합효소연쇄반응에서 모두 음성이었으며 나머지 3예는 각각 급성 화농성 농양, 전이성 선암종, 비호즈킨 림프종으로 이들 역시 중합효소연쇄반응 및 효소면역법에서 음성이었다.

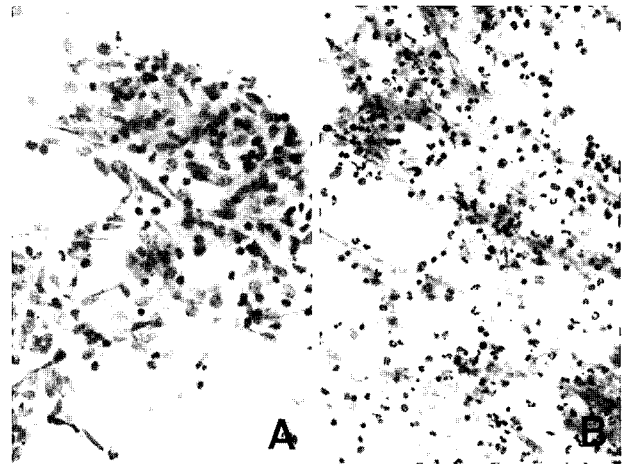


Fig. 1. Fine needle aspirate of cervical lymph node: It shows epithelioid granulomas(A) and acute inflammatory exudate with necrosis(B) (Papanicolaou, ×200).

중합효소연쇄반응 및 효소면역법에서 양성반응을 보였던 8예중 1예는 중합효소연쇄반응의 산물을 한천 겔 (agarose gel)에서 전기영동을 하였을 때 DNA 띠를 확인할 수 없었으나 중합효소연쇄반응 산물을 이용한 효소면역법 검색에서 양성이었다. 그러나 다른 7예는 다양한 양을 보이는 587 bp 크기의 DNA 띠를 보였다 (Fig. 2).

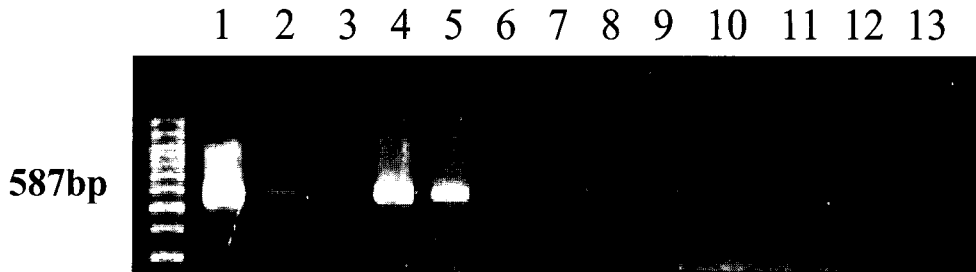


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of product of *Mycobacterium tuberculosis* Polymerase Chain Reaction (PCR) test on fine needle aspirates of patients with cervical lymphadenopathy . Lane 1, 2, 4, 5, 6, 8, and 9: Positive patients; Lane 3, 7, 10, 11, 12, and 13: Negative patients.

고찰

결핵성 림프절염은 폐장 이외에 발생하는 가장 흔한 유형의 결핵이다.¹¹⁾ 개발도상국의 결핵 유병율은 높으며 특히 림프절병증의 가장 흔한 원인으로 결핵이 30~52%에 이른다.¹²⁾ 국내의 경우에도 결핵성 림프절염은 양성 병변에 대한 세침흡인 세포검사의 분석에서 반응성 증식 다음으로 많다고 보고하고 있다.¹³⁾ 결핵 유병율이 높은 지역에서는 생검을 통한 외과병리학적 진단 직후 항결핵제의 화학요법을 시행한다. 그러나 외과적 생검은 환자의 피부에 흉터를 남길 수 있으며 생검병소의 감염에 의한 합병증 등을 유발할 수 있다. 이러한 단점을 보완할 수 있는 세침흡인 세포검사는 병리의사가 직접 시행함으로써 보다 빠르고 정확한 진단을 만들 수 있으며 환자에게도 경제적이고 합병증을 최소화할 수 있는 장점이 있다.

결핵성 림프절염의 세포병리학적 진단기준은 흡인된 표본의 회백색의 치즈양 괴사물질 등 육안상태와 더불어 Papanicolaou 염색표본에서 상피양 조직구로 구성된 육아종, 랑그한스 다핵거대세포 및 건락성 괴사이다. 이들중 단 하나의 구성성분만 관찰되는 경우도 있어 가능한 2~3회 이상 흡인시술을 시행함으로써 진단율을 높일 수 있다.^{7,14)} 결핵의 확진은 Ziehl-Neelsen 염색을 통한 결핵균의 존재 및 *M. tuberculosis*의 배양을 통한 분리에 의해서 이루어진다. 그러나 세침흡인 검체의 미생물학적 동정법에 의한 *M. tuberculosis*의 발견율은 매우 낮아 AFB 염색에서 양성율은 15~47%이며^{15,16)} 면역형광법으로 염색한 경우 45.5~56.4%로 전자에 비하여 조금 더 높다.^{17,18)} 세균배양법은 35~65%에 이르는 낮은 감수성과 6~8주

라는 오랜시간을 요하며 따라서 치료시기의 지연을 초래한다.^{4,19)} 세포도말표본에서 관찰되는 결핵성 육아종성 병변은 육아종성 병변을 보이는 다른 다양한 질환을 감별대상으로 하며 특히 유육종증, 전이성 암종, 악성 림프종, 육종성 병변, 바이러스나 세균성 감염, 톡소플라스모시스 등이 포함된다. 전통적으로 사용되어 왔던 결핵성 림프절염의 진단법인 조직 및 세포병리학적 검색은 상기한 단점 때문에 결핵균 확인을 위한 AFB 염색 및 항산성 세균배양을 병행하여 결핵성 감염질환을 확진하여 왔다. 그러나 중합효소연쇄반응을 통한 핵산증폭기술은 이러한 단점을 더욱 보완할 수 있다. 즉, 결핵균 검출에 대한 민감성 및 특이성의 증가, 진단시간의 단축 등의 장점이 있다. Tevere 등⁹⁾은 호흡기 검체를 통한 중합효소연쇄반응법으로 세포도말표본에 대한 AFB 음성 그룹에서 73.1%의 감수성을 보였으며 Tan 등²⁰⁾은 객담, 기관지-폐포강 세척액, 흉수액 등에서 100%의 감수성 및 85~95%의 특이성이 있었음을 보고하였다. 특히 세침흡인 세포검사에서의 반응성 증식으로 진단된 세침흡인 표본에 대한 중합효소연쇄반응에서 양성을 보인 예의 생검결과 결핵성 림프절염으로 확진하여 중합효소연쇄반응 검사의 유용성을 확인한 경우도 있었다. Back 등⁶⁾이 시행한 17예의 경부 림프절 세침흡인 검체에서 13예(76.4%)에 양성반응을 보였으며 Ersoz 등⁷⁾은 23예 중에서 19예(82.6%), Kim 등⁸⁾은 31예 중에서 19예(61%)의 양성 반응을 보고하여 기존의 세침흡인 세포검사, AFB 염색, 그리고 세균배양 등과 비교하여 진단율이 높았다.

저자들은 Tevere 등⁹⁾과 Wobeser 등¹⁰⁾에 의하여 기술된 바와 같이 세침흡인 검체를 이용한 중합효소연쇄

반응 및 효소면역법을 통하여 결핵균의 존재를 확인하였다. 15예의 환자중에서 8예가 결핵성 림프절염이었고 이들은 모두 중합효소연쇄반응 및 효소면역법에서 양성반응을 보였다. 다른 7예의 환자는 각각 반응성 림프절염, 농양, 전이성 암종 및 악성 림프종이었으며 모두 음성반응을 보였다. 두 예의 경우 Papanicolaou 염색표본에서 급성 염증세포를 동반한 건락성 괴사만을 보여 결핵의 세포학적 진단이 불가능하였으나 중합효소연쇄반응에서 양성 반응을 보였으며 생검에서도 광범위한 건락성괴사를 동반한 육아종성 병변을 보였다. Rajwanshi 등¹⁶⁾과 이 등²¹⁾이 보고한 바와 같이 육아종이 없이 무세포성 괴사물질만 있는 경우 육아종과 괴사가 동반된 경우와 비교하여 Ziehl-Neelsen염색에서 더욱 높은 AFB 양성율을 보였다는 결과로 미루어보아 세포도말표본에서 괴사만을 보이는 경우 중합효소연쇄반응 및 효소면역법의 적용은 세침흡인 세포검사 결과와 함께 결핵성 림프절염의 진단율을 높이는 데 기여할 수 있다고 생각한다. 다수의 중성백혈구와 대식구로 구성된 농양의 경우 결핵성 병변의 가능성을 완전히 배제할 수 없었으나 중합효소연쇄반응 및 효소면역법에서 음성소견을 보여 감별진단이 가능하였다. 흥미로운 점은 중합효소연쇄반응 및 효소면역법에서 양성반응을 보였던 8예중 1예는 중합효소연쇄반응의 산물을 한천 겔에서 전기영동을 하였을 때 DNA 띠를 확인할 수 없었으나 효소면역반응 검색에서 양성반응을 보여 바이오틴이 결합된 올리고뉴클레타이드 시발체를 이용한 효소면역법은 중합효소연쇄반응 증폭만을 통한 검색에 비하여 더욱 민감한 방법으로 생각된다. 한편, 본 연구자들이 시행한 중합효소연쇄반응 및 효소면역법은 기존의 중합효소연쇄반응법에 대한 보고와 비교하여 감수성 및 특이성이 높았다. 그러나 시행한 전체 표본수가 작으므로 통계학적으로 유의한 결과를 얻기 위하여 더욱 많은 예의 축적 및 분석이 필요할 것으로 생각한다.

결 론

결핵성 림프절염의 세침흡인 세포검사에서 중성구 및 괴사성 물질만을 보이는 경우 결핵 진단에 어려움이 많으며 외과적 생검을 추천하게 되는 경우가 많다. 따라서 세침흡인 세포검사와 더불어 중합효소연쇄반응 및 효소면역법을 동시에 수행하면 보다 정확하고 신속한 진단을 할 수 있으리라 생각한다.

참 고 문 헌

1. Artenstein AW, Kim JH, Williams WJ, Chung RC: Isolated peripheral tuberculous lymphadenitis in adults: current clinical and diagnostic issues. *Clin Infect Dis* 20:876-882, 1995
2. Lau SK, Wei WI, Hsu C, Engzell UC: Efficacy of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of tuberculous cervical lymphadenopathy. *J Laryngol Otol* 104:24-27, 1990
3. 김희성, 김대수, 오영륜, 고영혜, 이회정: 림프절 세침흡인 세포검사의 진단적 유용성과 한계 -생검으로 확진한 176예의 분석-. *대한세포병리학회지* 10:35-42, 1999
4. Gupta SK, Chugh TD, Sheikh ZA, al-Rubah NA: Cyto-diagnosis of tuberculous lymphadenitis. A correlative study with microbiologic examination. *Acta Cytol* 37:329-332, 1993
5. Singh KK, Muralidhar M, Kumar A, et al.: Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in granulomatous lymphadenopathy. *J Clin Pathol* 53:355-361, 2000
6. Baek CH, Kim SI, Ko YH, Chu KC: Polymerase chain reaction detection of Mycobacterium tuberculosis from fine-needle aspirate for the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *Laryngoscope* 110:30-34, 2000
7. Ersoz C, Polat A, Serin MS, Soyul L, Demircan O: Fine needle aspiration(FNA) cytology in tuberculous lymphadenitis. *Cytopathology* 9:201-207, 1998
8. Kim SS, Chung SM, Kim JN, Lee MA, Ha EH: Application of PCR from the fine needle aspirates for the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *J Korean Med Sci* 11:127-132, 1996
9. Tevere VJ, Hewitt PL, Dare A, et al.: Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR amplification with pan-Mycobacterium primers and hybridization to an M. tuberculosis-specific probe. *J Clin Microbiol* 34:918-923, 1996
10. Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al.: Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for Mycobacterium tuberculosis.. *J Clin Microbiol* 34:134-139, 1996
11. Appling D, Miller RH: Mycobacterium cervical lymphadenopathy: 1981 update. *Laryngoscope* 91:1259-1266, 1981
12. Gupta AK, Nayar M, Chandra M: Critical appraisal of fine needle aspiration cytology in tuberculous lymphadenitis. *Acta Cytol* 36:391-394, 1992
13. 김동원, 진소영, 이동화, 이찬수: 림프절종대의 세침흡인 세포검사의 진단적 유용성 -림프절의 세침흡인 세포검사 1,216예의 분석-. *대한세포병리학회지* 8:11-19, 1997
14. Jayaram G: Cytomorphology of tuberculous mastitis. A report of nine cases with fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol*

- 29:974-978, 1985
15. Radhika S, Gupta SK, Chakrabarti A, Rajwanshi A, Joshi K: Role of culture for mycobacteria in fine-needle aspiration diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Diagn Cytopathol* 5:260-262, 1989
 16. Rajwanshi A, Bhambhani S, Das DK: Fine-needle aspiration cytology diagnosis of tuberculosis. *Diagn Cytopathol* 3:13-16, 1987
 17. Kumar N, Tiwari MC, Verma K: AFB staining in cytodiagnosis of tuberculosis without classical features: a comparision of Ziehl-Neelsen and fluorescent method. *Cytopathology* 9:208-214, 1998
 18. Metre MS, Jayaram G: Acid-fast bacilli in aspiration smears from tuberculous lymph nodes. An analysis of 255 cases. *Acta Cytol* 31:17-19, 1987
 19. Dandapat MC, Mishra BM, Dash SP, Kar PK: Peripheral lymph node tuberculosis: a review of 80 cases. *Br J Surg* 77:911-912, 1990
 20. Tan MF, Ng WC, Chan SH, Tan WC: Comparative usefulness of PCR in the detection of Mycobacterium tuberculosis in different clinical specimens. *J Med Microbiol* 46:164-169, 1997
 21. 이동화, 진소영, 고은석, 광정자: 결핵 진단의 세침흡인 세포검사. 대한세포병리학회지 1:68-73, 1990