

객담도말 음성인 폐결핵환자의 기관지세척액에서 Amplicor PCR과 IS6110 PCR의 임상적 유용성에 관한 비교 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실¹, 폐질환 연구소², 임상병리학교실³,
건양대학교 의과대학 내과학교실⁴, 포천 중문의과대학 내과학교실⁵

이준구^{1,2}, 김영삼⁴, 박재민⁵, 고원기^{1,2}, 양동규^{1,2}
김세규^{1,2}, 장 준^{1,2}, 김성규^{1,2}, 최종락³

= Abstract =

Clinical Utility of Bronchial Washing PCR for IS6110 and Amplicor for the Rapid Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis in Smear Negative Patients

Jungu Lee, M.D.^{1,2}, Youngsam Kim, M.D.⁴, Jaemin Park, M.D.⁵,
Wonki Ko, M.D.^{1,2}, Donggoo Yang, M.D.^{1,2}, Sekyu Kim, M.D.^{1,2},
Joon Chang, M.D.^{1,2}, Sungkyu Kim, M.D.^{1,2}, and Jongrak Choi, M.D.³

*Department of Internal Medicine¹, Institute of Chest Disease², Department of Clinical Pathology³,
Yonsei University College of Medicine, Department of Internal Medicine College of Medicine, Konyang University⁴
Department of Internal Medicine College of Medicine, Pochon University⁵*

Background : There is a well recognized interlaboratory variation in the results using the polymerase chain reaction(PCR) to detect the IS6110 sequence. The clinical utility of a commercially developed PCR test (Amplicor) in bronchial washings for detecting pulmonary tuberculosis in smear negative patients was evaluated. The sensitivity and specificity of Amplicor was compared with that of an in-house PCR test used for detecting the IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis(M.tbc)* in the bronchial washing fluid

Methods : 66 patients whose sputum smear for *M. tbc* were negative or who could not produce any sputum were recruited from January 1999 to July 1999. They all had a bronchoscopy performed to determine if there were signs of hemoptysis, patients who could not cough up sputum, lung lesion that exclude pulmonary tuberculosis. Pulmonary tuberculosis was diagnosed on the basis of a positive culture or a response to anti-tuberculo-

Address for correspondence :

Sungkyu Kim, M.D., PhD.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine

134, Shinchon-dong, Seodaemoon-gu, Seoul, 120-752, Korea

Phone : 02-361-5410 Fax : 02-393-6884 E-mail : pulmo777@yumc.yonsei.ac.kr

sis therapy.

Results : 19 patients with tuberculosis were identified and samples from 16 patients were later confirmed by culture. Bronchial washing for Amplicor PCR revealed a sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 94.7%, 97.9%, 94.7%, 97.9%, respectively. Using IS6110 based PCR, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were of 73.7%, 87.2%, 70%, 89.1% respectively.

Conclusion : Bronchial washing for Amplicor PCR proved to be more useful than IS6110 based PCR in rapidly diagnosing smear negative pulmonary tuberculosis in patients where tuberculosis was likely to be differential and rapid diagnosis was essential for optimal treatment (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 213-221)

Key words : Bronchial washing, Amplicor PCR, IS6110 PCR.

서 론

우리나라 결핵은 1998년 감염성질환에 의한 사망률 중에서 57.3%로 수위를 차지하고 결핵사망률이 인구 10만명당 7.4명으로 국가결핵관리사업의 성과에도 불구하고 아직도 보건사회학적 문제로 남아있다¹. 결핵 환자의 발생은 젊은 층에서 점차 노인인구로 옮겨가는 경향을 보이고 임상양상도 매우 다양하게 나타나고 있어 감별해야 하는 질환이 증가하고 있다. 폐결핵의 진단은 새로운 진단기술의 발달에도 불구하고 주로 환자의 증상, 흉부 X-선, 객담의 균도말검사 및 배양검사에 의존하고 있어 현재의 검사실 수준으로는 배양결과를 알기까지 수주일이 소요되고 있다. 따라서 결핵을 신속하게 진단하기 위해서 새로운 검사방법의 도입과 임상적 적용이 요청되고 있다.

흉부엑스선상 폐결핵이 의심되나 객담도말에서 음성이거나 객담배출을 못하는 환자에서 치료자가 치료 시점을 결정하기 어려울 때 다른 질환과 감별하기 위해서 적극적으로 기관지 내시경을 시행하고, 기관지세척액이나 기관지폐포세척액을 이용하여 결핵균의 특이핵산절편을 증폭 합성하는 PCR법, 결핵균체성분중의 하나인 tuberculostreptic acid(TSA), 각종 가검물내 결핵균 항원에 대한 항체들이 활용되고 있다^{2,3}. 그 중에서 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction : 이하 PCR)은 많은 임상 연구가 있지만 연

구자마다 결과들이 달라 임상에서 활용하기에 아직 문제점이 많다⁴⁻⁸. 이런 이유로 초기에 PCR법에 관한 기대가 다소간 줄어들고 있으며 임상에서 보다 유용하게 활용하기 위해서 검사법의 향상과 표준화된 PCR법의 프로토콜이 필요하다.

이에 저자들은 상품화된 Roche사의 Amplicor *M. tuberculosis* kit와 IS6110을 프라이머를 사용한 in-house PCR을 이용하여 객담도말 음성인 환자의 기관지세척액에서 결핵균 검출을 위한 중합효소연쇄반응 검사를 시행하였다. 이 결과를 임상양상, 항산균염색, 결핵균 배양, 조직검사 및 흉부 X-선과 비교하여 두 검사법의 유용성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상환자

연세의료원에 내원한 환자 중에서 진단목적으로 기관지내시경을 시행 받은 환자를 대상으로 기관지세척액에서 결핵균에 대한 IS6110을 이용한 PCR검사법과 Roche사의 Amplicor *M. tuberculosis* kit를 동시에 시행하였다. 발열, 객담, 체중감소등의 임상양상이 폐결핵의 발병을 시사하고 흉부엑스선상 폐결핵이 의심되나 객담도말 항산균 검사를 3회 실시에도 항산균이 검출되지 않거나, 기관지 결핵이나 폐 실질내 병변

이 결핵으로 의심되거나, 폐결핵과 감별진단이 필요한 환자 또는 객담배출이 불가능한 환자를 대상으로 하였다. 통상적인 기관지 검사중에 환자의 상태에 따라 생리식염수 20-60cc를 병변이 있는 부위에서 세척 후 기관지세척액으로 검사에 활용하였다.

2. 기관지세척액 PCR법

가. IS6110을 이용한 PCR법

1) 기관지세척액에서 DNA를 추출하는 방법

기관지세척액을 4% NaOH으로 동량을 섞은 후 실온에서 20분간 방치한다. NaOH로 처리된 가검물을 3,000-4,500rpm에서 15-20분 동안 원심분리하고 상층액을 버린다. 전처리가 끝난 가검물을 1.5ml 분주하고 500 μ l의 1% NaOH를 넣어 액화시키고 끓는 물에 넣고 2분간 둔다. 검체를 다시 13,000rpm에서 3분간 원심분리하고 상층액을 버리고 tris-HCl Buffer 1ml로 세척한다. 이후 13,000rpm에서 3분간 원심분리하고 상층액을 버리고 증류수 1ml로 세척한다. 이 과정을 반복한 후 13,000rpm에서 3분간 원심분리한다 상층액을 버리고 glass bead에 0.1ml을 첨가한다. 1분간 bead beating후 13,000-15,000rpm에서 20초간 원심분리한 뒤 준비된 template로 PCR을 시행하였다.

2) PCR 방법

결핵균 PCR을 위해 IS6110 primer (5'-GCATCG-AGGTGGCCAGATGC, 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCCG-3')를 사용하였고, reaction buffer는 10mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 40mM KCl, 10mM Tris Hcl (pH 8.3)이 포함되어있다. 검체에서 추출한 DNA 2 μ l 을 가지고 잘 섞어준 뒤 5초간 원심분리한 후 2.5U taq polymerase를 넣어 PCR을 시행하였다. PCR cycle은 94도에서 5분간 predenaturation후 94도에서 1분, 60도에서 1분, 72도에서 1분씩 30 cycle을 시행하였고 PCR용액 10 μ l 을 TBE gel load buffer와 함께 1.2% agarose gel에 분주하

여 100 V의 직류로 약 40분간 전기영동시켰다.

나. Roche의 Amplicor *M. tuberculosis* kit

모든 재료는 kit 내에 포함된 것을 사용하였고 전 과정은 제조회사의 지시에 따라 시행하였다.

1) 기관지세척액에서 DNA를 추출하는 방법

전처리가 끝난 검체 100 μ l 를 500 μ l 의 세척액 (tris-HCl solution with 1% solubilizer)에 가하여 12,500 \times g에서 10분 동안 원침한 후 상층액을 버리고 100 μ l 의 용해액 (1% solubilizer, 0.4% NaOH)을 가하여 60 $^{\circ}$ C에서 45분 둔 다음 100 μ l 의 증화용액 (tris-HCl solution)을 가하였다.

2) DNA의 증폭

추출된 DNA의 증폭은 Perkin-Elimer 9600 Thermal Cycler(Perkin-Elmer Medical Instrments, Pomona, CA)를 이용하였고 반응혼합물은 Ampli-TaqTM(Taq polymerase), biotin 이 부착된 시발체, nucleotides, uracil-N-glycosylase(AmpEraseTM : Roch Molecular Systems, Inc.)등으로 구성되어 있다. 반응 혼합물 50 μ l 가 들어있는 시험관에 DNA추출이 된 검체 50 μ l 를 가하여 98 $^{\circ}$ C에서 20초간 2주기(cycle) 열변성(denaturation)하고 62 $^{\circ}$ C에서 20초간 결합(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extension시킨다음 94 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 45초로 35주기를 증폭시켰으며 검사때마다 양성 및 음성 대조를 포함시켰다. 증합효소연쇄반응에 사용한 시발체는 Mycobacterium의 16s ribosomal RNA의 conserved region에 있는 genus specific DNA region으로 584bp였으며 이미 증폭된 반응산물의 오염으로 인한 위양성을 막기위해 AmpErase를 반응혼합물에 첨가하였다.

3) Hybridization

증폭이 끝난 100 μ l 의 병선용액(denaturation solution, 1.6% NaOH)을 가하여 실온에서 10분 방치한 다음 이중 25 μ l 를 취하여 Hybridization solu-

tio(sodium phosphate solution) with 0.2% solubilizer and 25% chaotropel 100u가 들어있는 microwell plate에 가한다. 각 well에는 M. tuberculosis DNA에 특이한 oligonucleotide소식자가 부착되어 있어서 37°C에서 90분간 방치하면 biotin이 부착된 반응산물이 포착된다.

4) 반응산물의 검출

Hybridization이 끝난 plate를 buffer로 세척하여 부착되지않은 증폭산물을 제거한 다음 avidin-horse-radish peroxidase conjugate를 가진 용액 100 μl를 각 well에 가하여 37°C에서 15분간 방치한다. 부착되지 않은 conjugate를 제거하기 위해 buffer로 세척하고 기질(H₂O₂)과 발색제(tetramethylbenzidine)가 들어있는 용액 100 μl를 가한 다음 10분 후에 100 μl의 정지용액(sulfuric acid)를 가해 peroxidase를 불활성화 시킨다. microwell plate reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하고 0.34이상의 흡광도를 가진 검체를 양성으로 판정하였다.

결 과

1. 대상환자의 질환별 분류

대상환자는 66명으로 남자 40명, 여자는 26명이고

평균연령은 53세(16-82) 이었다. 대상환자 66명 중 활동성 폐결핵으로 판정받은 환자는 19명, 비활동성 폐결핵은 4명, 다제내성 폐결핵환자가 1명이었다. 임파선종양으로 항암제 치료 중인 환자에서 폐결핵이 병발되었고 신장이식이나 면역부전바이러스 감염환자는 없었다.

활동성 폐결핵으로 진단받은 환자 19명 중 16명이 객담과 기관지 세척액에서 도말 및 배양검사로 폐결핵으로 확진되었다. 3명은 객담과 기관지세척액의 세균학적 검사에서 모두 음성이었으나, 흉부 엑스선 및 흉부 전산화단층촬영에서 임상적으로 결핵이 의심되고 1주일간 항생제 치료에도 반응이 없어 항결핵제로 치료하여 3개월 추적기간동안 폐병변이 호전되었다. 활동성 폐결핵 환자 중 1명은 다제내성 폐결핵이었고 비활동성 결핵은 4명이었다.

결핵이의 다른 질병이 있는 환자는 47명으로, 세균성 폐렴 8명, 폐암 12명, 만성폐쇄성폐질환 5명, 기관지확장증 3명, 폐허탈 3명, 심부전에 의한 폐부종 1명, 객혈로 기관지경을 시행하였으나 원인이 규명되지 않은 9명이었다. 그리고 방사선폐렴 1명, 폐농양 1명이었다(Table 1).

2. 검사결과

기관지세척액에서 도말양성인 활동성 결핵환자는 19명 중 3명으로 민감도 15.8%이었고, 배양검사는 19

Table 1. Final diagnoses of patients

Diagnosis	Numbers of patients		
Active pulmonary tuberculosis	19		
Inactive pulmonary tuberculosis	4		
Nontuberculous disease	43		
Lung cancer	12	Hemoptysis	7
Pneumonia	8	Atelectasis	3
Chronic obstructive lung disease with superinfection	5	Pulmonary edema	1
Bronchiectasis	3	Radiation pneumonitis	1
Pyogenic lung abscess	3		

Table 2. Overall performance of the amplicor test, in-house PCR, cultures, and direct microscopy of the detection of *M. tuberculosis*

Method	Sensitivity(%)	Specificity(%)	Predictive value(%)	
			Positive	Negative
Amplicor test	94.7	97.9	94.7	97.9
in-house PCR	73.7	87.2	70	89.1
Culture	84.2	100	100	92.1
Microscopy	15.8	100	100	74.6

Table 3. Comparison of the amplicor *M.tuberculosis* test, in-house PCR, and culture for detecting detection of *M.tuberculosis* in bronchial washing specimens

	Result by	
	PCR	Culture
		Positive
Amplicor (+) - in-house PCR (+)	12	2
Amplicor (+) - in-house PCR (-)	3	2
Amplicor (-) - in-house PCR (+)	0	6
Amplicor (-) - in-house PCR (-)	1	40

명중에 16명으로 민감도는 84.2%이었다. 기관지세척액을 이용한 IS6110 PCR의 경우 19명 중 14명이 양성으로 민감도는 73.7%이었고 특이도는 87.2%이었다. Amplicor PCR은 19명 중 18명이 양성으로 민감도는 94.7%이고 특이도는 97.9%이었다. 개별 검사법의 양성 예측도는 기관지 세척액 도말과 배양검사는 각각 100%이었고 IS6110 PCR은 70%, Amplicor PCR은 94.7%이었다. PCR검사법의 음성예측도와 정확도는 IS6110 PCR은 89.1%, 83.3%이고 Amplicor PCR은 97.9%, 96.9%이었다 (Table 2).

기관지세척액에서 결핵균 배양양성인 16명 중에서 IS6110 PCR은 12명이 양성으로 민감도가 75%이었고 Amplicor PCR은 15명이 양성으로 93.7%로 Amplicor PCR이 더 높은 진단율을 보였다. 결핵균 배양이 양성이지만 IS6110 PCR과 Amplicor PCR이 모두 음성인 경우도 한명이 있었다 (Table 3).

기관지세척액 항산균 도말양성인 3명에서 Ampli-

cor PCR법은 모두 양성이었으나 IS6110 PCR은 2명 양성이고 1명은 음성이었다. 위양성은 IS6110 PCR은 6명이었고 Amplicor PCR은 1명으로 Amplicor PCR이 낮았다.

고 찰

폐결핵이 의심되는 환자에서 객담도말 음성일 경우 지속적인 폐암의 증가와 결핵의 비정형적인 임상양상으로 인해 다른 질환을 감별해야 하는 상황을 임상에서 자주 경험하게 된다. 세균학적으로나 조직학적 증거가 불충한 상태에서 폐결핵 의심하에 시험적으로 약제를 투여할 때 비결핵성 질환일 경우에 진단이 늦어져 치료지연이 발생할 수 있다. 이와 더불어 AIDS와 같이 세포성 면역력이 저하되었거나 장기 이식 후 면역억제제를 복용하는 환자에서 결핵이 병발되면 다른 질환과 감별도 어렵고 자칫 진단이 지연되어 치료가 늦어진다면 환자에게 치명적일 수 있기 때문에 적극적인 진단

이 필요하다.

이러한 시도의 일환으로 객담도말 음성인 환자에서 기관지경을 이용한 진단수기가 자주 활용되고 있는데 기관지세척액과 기관지폐포세척액으로 세균학적 검사나 조직학적 검사를 시행하면 결핵을 약 90%까지 진단할 수 있다⁹⁻¹¹. Gracia 등에 의하면 결핵균 도말 음성인 환자 20명에서 기관지폐포세척액, 기관지세척액, 기관지내시경 후 객담으로 폐결핵 17명 중에 16명을 진단하였고⁹, Chan 등은 객담도말 음성인 폐결핵 환자에서 기관지폐포세척액과 기관지경 조직검사로 진단율을 향상시킬수 있었다¹¹. 하지만 기관지경을 이용한 검사는 항산균 도말검사로 결핵이 진단되는 경우는 적고 결핵균 배양검사를 기다려야 하는 단점으로 임상에서 활용시 제한이 많다. 본 연구에서도 기관지세척액에서 항산균 도말양성은 3명(15.8%)으로 검출율이 낮았고 배양검사는 19명 중 16명(84.2%)으로 검출율은 높으나 평균적으로 결핵균 배양 및 동정까지 약 40일이 소요되었다.

객담도말 음성이지만 결핵이 의심되는 환자에서 통상적으로 객담에서 분자생물학적 방법을 권고하지 않지만 결핵 유병률이 높은 우리나라에서 객담도말 음성인 결핵환자를 조기에 진단하기 위해서 임상적 상태를 고려하여 검체를 잘 선택한다면 활용도 가능하다. 즉 임상적으로 결핵이 의심되지만 결핵균 도말에서 음성이고 배양검사의 결과를 수 주일을 기다리게 되는 상황에서 기관지경검사를 시행하고 항산균도말 및 배양검사와 함께 PCR검사를 시행한다면 신속한 결과를 얻을 수 있어 조기에 결핵환자를 치료할 수 있게 될 것이다. PCR 검사법은 1989년 결핵진단에 사용된 이후 임상에서 활발하게 이용되고 있는 것과는 달리 검사결과가 검사자 또는 검사실간의 차이가 많이 개선이 필요하다¹²⁻¹⁴. Noordhoek의 의하면 PCR법의 신뢰도를 검증하기 위해 7개의 검사실을 대상으로 10³ *M. bovis*의 검출을 의뢰하였을 때 각 검사실의 민감도와 특이도가 2-90%, 3-77%로 검사실들 사이에도 차이가 현저하였다¹². 다른 연구에 의하면 30개 검사실 중에서 17개 검사실이 잘못된 결과를 보고하였고

전체 보고건수에서 위양성율이 23%이었으며 상품화된 검사법과 in-house PCR사이에는 차이는 없었다¹⁴. 이런 문제들 때문에 임상에서 분자생물학적 검사에 결핵환자 진단을 전적으로 의존하는 것은 치료의 혼란을 초래할 수 있어 PCR검사의 신중한 활용이 요구되고 표준화된 프로토콜과 검사법의 개선이 절실히 필요하다.

국내에서 결핵 진단에 활용하고 있는 결핵균 PCR법은 주로 IS6110 프라머를 사용한 in-house PCR법으로 통상적인 검사실 수준에서 일정 수준 이상의 민감도나 특이도를 유지하기는 쉽지 않다. 최근에는 상품화된 PCR 검사법도 도입되어 임상에서 사용 중인데 상품화된 핵산증폭 검사법은 in-house PCR법과 비교할 때 검사과정이 자동화로 편리하고 검사자간의 오류를 줄일 수 있는 장점으로 관심이 점차 높아지고 있다¹⁵⁻¹⁸. 대표적으로 Amplicor *M. tuberculosis* test(Roche)와 Gen-Probe MTD(*Mycobacterium tuberculosis* Direct test)가 소개되어 이용되고 있으며 두 검사법의 민감도는 객담도말 양성인 경우 각각 95%, 96%로 높으나 객담도말 음성인 환자에서는 48%, 53%로 낮아 미국 FDA도 객담도말 양성인 환자에서 결핵균 진단에만 허용하고 있다¹⁹.

본 연구는 통상적인 기관지경 시술 하에서 얻은 기관지세척액을 검체로 이용하였는데 IS6110 PCR법의 민감도는 73.7%이었고 Amplicor *M. tuberculosis* kit는 94.7%로 Amplicor PCR이 다소 높았다. 임상적으로 결핵이 의심되지만 기관지세척액 및 객담 배양에서 모두 음성으로 세균학적으로 결핵을 진단할 수 없었던 3명이 Amplicor PCR에 양성이었다. Amplicor PCR에 양성인 3명은 다제내성 결핵이 의심되었지만 균동정이 되지않아 항결핵제를 사용중인 1명, 임파중으로 약물치료를 받아오던 중 결핵이 병발한 1명, 폐암과 폐결핵이 함께 동반된 1명으로 조기에 치료하여 임상적인 호전되었다. 다제내성 환자의 경우에 수차례 기관지경이 시행되었는데 기관지 세척액의 Amplicor PCR의 혼광도가 검사시점에 따라 각기 다른 OD값을 보여 해석상에 어려움이 많았다. 이

러한 차이는 검체를 모으는 시점, 기관지세척액의 부위와 양, 환자의 상태, 항결핵제 복용기간에 따른 차이가 영향을 미쳤을 것으로 추측되며 임상양상과 비교 해석하는 것이 중요하다.

기관지세척액과 기관지폐포세척액에서 IS6110 PCR을 시행한 여러 연구에서도 보고자마다 결과가 달라 임상에서 결핵환자 진단에 활용할 때 주의가 필요하다. 모등⁷이 기관지폐포세척액에서 IS6110 PCR 검사를 시행하여 민감도, 특이도, 양성예측도 각각 40%, 95%, 89%로 보고한 것과는 달리 기관지경흉인액과 기관지세척액으로 시행한 IS6110 PCR을 시행한 다른 연구²⁰는 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도가 97.2%, 73.2%, 82.7%, 95.2%로 검체의 종류와 검사자에 따라서 다른 결과를 보였다. In-house PCR과 Amplicor의 비교한 한 연구들도 같은 경향으로 in-house PCR법이 민감도 92.6%로 Amplicor의 70.4%에 비해 더 높은 결과를 보이거나 Amplicor PCR과 IS6110 PCR법의 민감도가 각각 86.5%, 83.6%로 차이가 없었다^{4,21}. 이러한 차이는 검체의 종류, 객담에서 항산균도말 양성의 비율, 검체 보관 및 취급, 검사시점, 검사방법, 검사자의 숙기 등 복합적인 요인에서 기인한 것으로 추정된다. 본 연구처럼 기관지세척액을 이용하여 두 검사를 비교한 연구는 없어 상호 비교가 어렵지만 기관지세척액에서는 Amplicor PCR이 더 우수하였다.

본 연구도 다른 연구^{22,23}와 같이 결핵의 과거력이 있는 경우에 위양성이 많았는데, IS6110 PCR은 66명중 6명(9%)에서 위양성이었고 Amplicor의 위양성인 1명이었다. IS6110 PCR에서 위양성은 과거 결핵을 앓은 경우 3명, 폐암 2명. 폐농양에서 1명이었고, Amplicor에서 위양성은 폐결핵 과거력이 명확하지 않은 폐렴환자 1명이었다. Amplicor에서 위양성이 적은 것은 검사과정중 Amplicor kit는 DNA 추출과정에서 하나의 시험관에서 이루어지기 때문에 검체간의 오염을 줄일 수 있고 증폭전에 검체에 uracil N-glycosylase를 첨가하여 오염된 반응 산물을 억제하여 위양성을 최소화할 수 있었다고 할 수 있다.

IS6110 PCR법은 숙련된 검사실에서 높은 민감도를 보이지만 통상적인 검사실에서 오염을 줄이고 표준화하기는 어려워 향후 임상에서 활용하기 위해 위양성을 줄이기 위한 노력이 필요하다.

객담도말 음성인 환자에서 기관지세척액 이용한 Amplicor PCR법은 IS6110 PCR에 비해 폐결핵 진단에서 민감도가 높고 위양성률도 낮아 결핵을 신속하게 진단할 수 있어 불필요한 치료지연을 피할 수 있었다. 하지만 현재로서 기관지세척액을 이용한 결핵균 PCR법도 전통적인 결핵균 도말 검사 및 배양검사를 대체할 수 없고 보완적 검사로 활용이 가능할 것이다. 본 연구의 제한점으로는 HIV 감염, 장기 이식환자, 골수이식환자들이 다수 포함되어 있지 못해 비결핵마이크로박테리움에 의한 감염이나 중복감염 또는 비정형적인 임상적 상황에서 기관지세척액을 활용한 결핵균 PCR법이 임상적으로 유용하기에는 뒷받침할 수 있는 연구결과가 부족하다. 따라서 기관지세척액을 활용한 결핵균 PCR법이 면역억제 환자에서 활용하기 위해 향후 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

임상에서 흉부 엑스선상 폐결핵이 의심되거나 객담 도말에서 음성이거나 객담배출을 못하는 환자에서 신속한 진단을 위해 기관지세척액에서 상품화된 Roche사의 Amplicor *M. tuberculosis* kit와 IS6110 in-house PCR의 유용성을 알아보고자 하였다.

방 법 :

객담 항산균도말에서 음성인 환자 혹은 결핵과 감별진단이 필요한 환자를 대상으로 기관지내시경을 시행하여 기관지세척액에서 항산균 도말, 결핵균배양, IS6110 PCR검사법, Roche사의 Amplicor PCR를 동시에 시행하였다.

결 과 :

기관지 세척액을 통한 항산균도말에서 활동성 결핵환자 19명 중 3명이 진단되어 민감도 15.8%이었고 배

양검사는 19명 중에 16명으로 민감도는 84.2%이었다. 기관지세척액을 이용한 IS6110 PCR의 경우 19명 중 14명이 양성으로 민감도는 73.7%이었고 특이도는 87.2%이었다. Amplicor *M. tuberculosis* kit는 19명에서 18명이 양성으로 민감도는 94.7%이고 특이도는 97.9%이었고 3명은 PCR과 임상양상으로 진단이 가능하였다. 위양성은 IS6110 PCR은 6명 이었고 Amplicor PCR은 1명이었다. 개별 검사법의 양성 예측도는 기관지 세척액 도말과 배양검사는 각각 100%이었고 IS6110 PCR은 70%, Amplicor PCR은 94.7%이었다. PCR검사법의 음성예측도와 정확도는 IS6110 PCR은 89.1%, 83.3%이고 Amplicor PCR은 97.9%, 96.9%이었다.

결 론 :

객담도말 음성인 환자의 진단에서 기관지경세척액을 이용한 Amplicor PCR법은 IS6110 PCR에 비해 폐결핵 진단의 감수성이 높았고 위양성률도 낮아 결핵을 신속하게 진단할 수 있어 불필요한 치료지연을 피할 수 있었다. 상품화된 PCR 검사법은 임상에서 결핵의 진단율을 높이고 수시간내 결과를 빨리 확인할 수 있는 장점은 있으나 통상적인 검사로 활용하기 위해서는 향후 연구가 더 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. 사망원인통계연보, 1998, 통계청
2. Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis : current clinical validity and future perspectives. *Eur Respir J* 1997;10(8): 1877-91
3. 송정섭. 폐결핵의 진단. *결핵 및 호흡기질환* 1999;46(4):466-75
4. Schirm J, Oostendorp LA, Mulder JG. Comparison of Amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995;33(12):3221-4

5. 박문환, 최춘한, 김남진. 폐결핵에 있어서 기관지 폐포세척액 결핵균 검사 및 PCR의 진단적 가치. *결핵 및 호흡기질환* 1996;43(2):128-37
6. 이명희. 결핵균 검출을 위한 Amplicor PCR kit의 평가. *대한임상병리학회지* 1996;16(3):364-72
7. 모은경, 경태영, 김동규, 박명재, 이명구, 현인규, 정기석, 이경화. 객담도말 음성인 환자에서 기관지 폐포 세척액 결핵균 중합 효소 연쇄반응 검사의 유용성. *결핵 및 호흡기질환* 1998;46(3):519-28
8. Brugiére O, Vokurka M, Lecossier D, Mangiapan G, Amrane A, Milleron B, Mayaud C, Cadranel J, Hance AJ. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis using sequence capture polymerase chain reaction. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(4):1478-81
9. 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* 1988;93(2):329-32
10. Baughman RP, Dohn MN, Loudon RG, Frame PT. Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage in tuberculosis and fungal infections. *Chest* 1991;99(1):92-7
11. Chan HS, Sun AJ, Hoheisel GB. Bronchoscopic aspiration and bronchoalveolar lavage in the diagnosis of sputum smear-negative pulmonary tuberculosis. *Lung* 1990;168(4):215-20
12. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, Godfrey-Faussett P, Cho SN, Shinnick T, Svenson SB, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2):277-84
13. Noordhoek GT, Kaan JA, Mulder S, Wilke H, Kolk AH. Routine application of the polymerase

- chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Pathol* 1995; 48(9):810-4
14. Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2522-5
 15. Beavis KG, Lichty MB, Jungkind DL, Giger O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33(10):2582-6
 16. Vuorinen P, Miettinen A, Vuento R, Hallstrom O. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test and Roche Amplicor *Mycobacterium Tuberculosis* Test. *J Clin Microbiol* 1995;33(7):1856-9
 17. Cartuyvels R, De Ridder C, Jonckheere S, Verbist L, Van Eldere J. Prospective clinical evaluation of Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test as a screening method in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 1996;34(8):2001-3
 18. Moore DF, Curry JI. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by Amplicor PCR. *J Clin Microbiol* 1996;33(10):2686-91
 19. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? American Thoracic Society Workshop. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(5):1804-14
 20. Wong CF, Yew WW, Chan CY, Au LY, Cheung SW, Cheng AF. Rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis via fiberoptic bronchoscopy: utility of polymerase chain reaction in bronchial aspirates as an adjunct to transbronchial biopsies. *Respir Med* 1998;92(6):815-9
 21. Se Thoe SY, Tay L, Sng EH. Evaluation of Amplicor- and IS6110-PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Singapore. *Trop Med Int Health* 1997;2(11):1095-101
 22. Schluger NW, Kinney D, Harkin TJ, Rom WN. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 1994;105(4):1116-21
 23. Querol JM, Farga MA, Granda D, Gimeno C, Garcia-de-Lomas J. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1995;107(6):1631-5