

## 임상검체별 결핵균 검출을 위한 자동화 중합효소연쇄반응 검사의 유용성

가톨릭대학교 대전성모병원 진단검사의학과

최우순·신소영

### Usefulness of Automated PCR Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples

Woo-Soon Choi and So-Young Shin

Department of Laboratory Medicine, Daejeon St. Mary's Hospital,  
College of Medicine, the Catholic University, Daejeon 301-723, Korea

The purpose of this study was to evaluate the usefulness of the automated TB-PCR assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. The 807 cases were analyzed with their TB-PCR, AFB smear and culture in bronchial washing fluids, sputum and body fluids samples. The TB-PCR positive of the bronchial washing fluid, sputum and body fluids were 11.3%, 7.3% and 3.6%, respectively, in cases of AFB smear-negative and culture-negative. The sensitivity values of the bronchial washing fluid, sputum and body fluids were 93.3%, 100% and 50%, respectively, according to the culture result. The sensitivity of body fluids was lower than that of the bronchial washing fluid and sputum. The specificity values of the bronchial washing fluid, sputum and body fluids were 83.3%, 89.0% and 95.7%, respectively, according to the culture result. In conclusion, the automated TB-PCR assay proved to be a useful method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the bronchial washing fluid and sputum. But we think that there is still a need for us to study body fluids further.

**Key words** : Clinical sample, Automated tuberculosis polymerase chain reaction(TB-PCR)

## I. 서 론

결핵은 *Mycobacterium tuberculosis*에 의해 발생하는 만성감염성질환으로 폐결핵이 가장 많으며, 특히 HIV 감염의 확대, 면역억제제의 사용 등으로 결핵의 양상이 변하면서 폐외 결핵도 증가하고 있다(Hamer 등, 2002; Field 등, 2004).

교신저자 : 최우순, (우)301-723 대전시 중구 대흥동 520-2,  
가톨릭대학교 대전성모병원 임상병리과  
Tel : 042-220-9049  
E-mail : woojung 211@hanmail.net

세계보건기구에 의하면 오늘날 감염성 질환 중 전세계적으로 사망률 1위를 차지하는 질환으로 국내에서도 결핵환자가 약 70만 명 이상인 것으로 보고 되고 있다. 국립보건원과 결핵협회에 따르면 2001년 현재 우리나라는 전국적으로 약 39만 명의 결핵 환자가 치료를 받고 있으며, 결핵으로 말미암은 사망률이 인구 10만 명당 6.7명(연간 3천여명)으로 OECD 회원국 중 가장 높게 나타나 있다(국립보건원 등, 2003; WHO Report, 2004).

이러한 결핵의 진단에 이용되는 보편적인 방법으로는 흉부 X선 검사, 검체내에서의 항산균의 염색 및 배양검

사 등이 있으나, *M. tuberculosis*의 염기배열이 밝혀지고 일부분의 DNA만을 선택적으로 대량 증폭시킬 수 있는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction test for *M. tuberculosis*, TB-PCR)방법이 개발되면서 결핵균에 대한 민감도와 특이도를 높이고 검사기간도 단축시킬 수 있는 중요한 검사방법으로 진단에 이용하고 있다(최 등, 1993; 김 등, 1997; 유 등, 2004).

일반적으로 폐결핵 진단을 위한 객담 또는 기관지세척액을 이용한 TB-PCR 검사에 대한 여러 연구가 있었으나(박 등 1996; 이 등, 2001; 이 등, 2005) 각종 체액 검체에 대하여는 그의 연구가 미흡하였다(Bonington 등, 1998; Mitarai 등, 2000). 이에 저자들은 결핵 진단을 위한 객담, 기관지 세척액 이외에 각종 체액으로 결핵 진단을 위한 자동화 기기인 COBAS AMPLICOR MTB PCR assay(Roche Molecular System, Inc., Branchburg, NJ, USA)를 이용한 TB-PCR 검사의 유용성을 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

2004년 10월부터 2005년 12월까지 가톨릭대학교 대전 성모병원 진단검사의학과 분자생물학부와 미생물부에 의뢰된 검체로 항산균 도말검사, 결핵 배양검사, TB-PCR 검사를 의뢰한 807예를 대상으로 하였고, 항산균 도말검사, 배양검사, TB-PCR 검사에서 이 중 하나의 검사라도 양성인 경우는 최종 진단에서 *M. tuberculosis* 또는 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM) 여부를 확인 하였다.

### 2. 방법

#### 가) 항산균 도말검사, 배양검사

기관지 세척액 및 체액은 멸균 튜브에 5 mL 이상 충분히 받아오도록 하였고, 객담은 약 5 mL 객담전용 튜브에 받은 것을 실시하였으며, 항산균 도말검사는 객담은 직접 도말하였고, 기관지세척액과 각종 체액은 원심한 후 침사를 슬라이드에 도말하여 Ziel-Neelsen 염색을 실시하였다. 배양검사는 각종 체액은 원심 후 슬라이드 도말 후 남은 침사를 이용하였고, 객담과 기관지 세척액은 4% NaOH

를 동량 넣어 진탕한 후 15~20분간 방치하였으며, 30분을 넘지 않도록 한 후, 3,000 rpm 15분간 원심 분리하여 침사를 3% Ogawa 배지에 접종하여 37°C에서 최대 8주간 관찰하였다.

### 나) 결핵균 TB-PCR 검사

#### 1) 검체처리

TB-PCR 검사의 전 처리는 기관지 세척액과 객담, 각종 체액 검체는 50 mL 침사용 튜브에 모두 옮기고 4% NaOH로 동량 넣어, 진탕한 후 15~20분간 방치하였으며, 30분을 넘지 않도록 하였다. 그 다음 증류수를 동량 넣어 혼합 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 후 침사를 TB-PCR에 이용하였다. 각종 체액 중 검체량이 적은 뇌척수액은 전 처리를 실시하지 않고 직접 1.5 mL 튜브에 옮기고 원심 후 침사를 이용하였다.

#### 2) TB-PCR

제조회사의 방법에 따라 washing buffer 500 µL를 미리 1.5 mL 튜브에 분주해 놓은 곳에 침사 100 µL를 옮겼다. 진탕한 후 다시 13,000 rpm에서 10분간 원심 후 상층액을 제거한 후 침사에 lysis 용액 100 µL을 넣고, 진탕 후 heating block에서 60°C, 45분간 반응하였다. Neutralization 용액 100 µL 넣고 진탕 후 3,000 rpm에서 3~5초간 원심 후 상층액 50 µL와 master mix 50 µL를 반응튜브에 넣고, AMPLICOR(Roche Molecular System, Inc., Branchburg, NJ, USA) 기기에서 검사하여, OD 0.35 이상을 양성으로 하였다.

### 3. 통계처리 및 결과 분석

통계분석은 Window용 SPSS 프로그램(SPSS 11.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA)을 이용하였다. 검사 성적은 동일한 검체로 배양검사 기준으로 항산성 도말검사와 TB-PCR 결과를 비교하였고, 항산균 도말검사, 배양검사, TB-PCR 검사에서 이 중 하나의 검사라도 양성인 경우는 최종 진단에서 *M. tuberculosis* 또는 NTM 여부를 확인 하였다. 검사 성적은 배양검사 기준으로 항산성 도말검사와 TB-PCR 결과를 비교하였고, 동일한 검체로 분석하였다. 유의성 검정은 paired T-test를 이용하였다.

### III. 결 과

#### 1. 검체별 TB-PCR과 AFB, Culture 결과 비교.

##### 1) 기관지 세척액 TB-PCR 결과

기관지세척액 534 검체 중 25.3%(135/534)에서 TB-PCR 양성을 보였으며, 배양검사나 항산균 도말검사 혹은 둘 모두 양성이고 TB-PCR 음성인 검체는 전체 대상자 중 1.3%(7/534)를 보였고, 이 중에서 배양검사 음성으로

항산균 도말검사 양성이며 TB-PCR 음성인 검체는 3예로 그 중 2예는 NTM이었으며, 1예는 검체 부적합으로 나타났다. 배양검사와 항산균 도말검사 모두 음성인 경우 중 TB-PCR 양성은 11.3%였다(Table 1).

##### 2) 객담 TB-PCR 결과

객담 검체 103예 중 13.6%에서 TB-PCR 양성이며, 배양검사와 항산균 도말검사 모두 음성이고 TB-PCR 양성인 검체는 7.3%였다. 배양검사와 항산균 도말검사 모두

**Table 1.** Comparison between AFB culture and TB-PCR by AMPLICOR from bronchial washing fluids

Culture	AFB stain	TB-PCR(+)	TB-PCR(-)	Total
Positive	Positive	33(100)	0( 0.0)	33(100)
	Negative	23(85.2)	4(14.8)	27(100)
	Sub-total	56(93.3)	4( 6.7)	60(100)
Negative	Positive	29(90.6)	3( 9.4)	32(100)
	Negative	50(11.3)	392(88.7)	442(100)
	Sub-total	79(16.3)	395(83.3)	474(100)
Total		135(25.3)	399(74.7)	534(100)

**Table 2.** Comparison between AFB culture and TB-PCR by AMPLICOR from sputum

Culture	AFB stain	TB-PCR(+)	TB-PCR(-)	Total
Positive	Positive	2(100)	0( 0.0)	2(100)
	Negative	1(100)	0( 0.0)	1(100)
	Sub-total	3(100)	0( 0.0)	3(100)
Negative	Positive	4(100)	0( 0.0)	4(100)
	Negative	7( 7.3)	89(92.7)	96(100)
	Sub-total	11(11.0)	89(89.0)	100(100)
Total		14(13.6)	89(96.4)	103(100)

**Table 3.** Comparison between AFB culture and TB-PCR by AMPLICOR from body fluids

Culture	AFB stain	TB-PCR(+)	TB-PCR(-)	Total
Positive	Positive	1(100)	0( 0.0)	1(100)
	Negative	1(33.3)	2(66.7)	3(100)
	Sub-total	2(50.0)	2(50.0)	4(100)
Negative	Positive	1(100)	0( 0.0)	1(100)
	Negative	6( 3.6)	159(96.4)	165(100)
	Sub-total	7( 4.2)	159(95.8)	166(100)
Total		9( 5.3)	161(94.7)	170(100)

음성인 경우 중 TB-PCR 양성은 없었으며, NTM은 없었다(Table 2).

### 3) 각종 체액 TB-PCR 결과

각종 체액 검체 170예 중 14.3%에서 TB-PCR 양성이고, 배양검사나 항산균 도말검사 혹은 둘 모두 양성이고 TB-PCR 음성인 검체는 전체 대상자 중 1.2%(2/170)를 보였고, 배양검사와 항산균 도말검사 모두 음성인 경우 중 TB-PCR 양성 3.6%였으며, NTM은 없었다(Table 3).

## 2. 검체별 민감도와 특이도

배양검사 양성자를 기준으로 TB-PCR 양성 93.3%, 객담 100%로 높았으며, 체액은 50%로 낮은 결과를 보였고, 배양검사에서 음성이며 TB-PCR 양성 16.7%, 객담 11.0%, 각종 체액 4.3%로 나타났다(Table 4).

배양검사 기준으로 민감도와 특이도는 기관지 세척액 93.3%와 83.3%, 객담은 100%와 89.0%로 높았으나 체액은 50%, 95.7%로 민감도가 낮았다(Table 5).

## IV. 고 찰

결핵의 진단에 있어서 TB-PCR은 조기 진단에 매우 유

용한 방법으로 이용되고 있으며, 많은 연구와 보고가 이루어지고 있다. 본 연구는 임상에서 많이 이용되고 있는 자동화된 TB-PCR 중 일반적으로 이용되는 기관지 세척액과 객담뿐 만 아니라 각종 체액을 대상으로 실시하였다.

의뢰된 검체는 기관지세척액이 66.2%로 진단 검사에 가장 많이 이용되었으며, 객담, 체액 순으로 나타났다.

검체별 항산균 도말검사와 배양검사 둘 다에서 음성인 검체 중 TB-PCR 양성인 경우는 기관지세척액에서 11.3%, 객담은 7.3%, 각종 체액이 3.6%로 나타나 항산균 도말검사와 배양검사보다 TB-PCR이 매우 유용한 검사임을 확인 하였다.

민감도와 특이도는 배양검사 기준으로 기관지세척액 93.3%와 83.3%, 객담은 100%와 89.0%의 결과로 Piersimoni 등(2003)의 민감도 82.3~92.4%, 특이도 93.7~100%와 이 등(2005)의 결핵환자 객담에서 88.8%, 86.8%로 기관지세척액과 객담은 비슷한 결과를 보였으나, 각종 체액의 민감도와 특이도는 50%와 95.7%로 Mitarai 등(2000)의 27.3%와 97.6%, Bonington 등(1998)의 28.6%와 100%로 민감도에서 타 저자보다 높은 결과를 보였지만 기관지세척액과 객담 검체보다는 낮은 결과를 보여 체액에 대한 연구가 더욱 필요하리라 생각된다.

임상검체 중 항산균 도말검사 또는 배양검사 양성인 9예에서 TB-PCR 음성이었다. 그 중에서 항산균 도말검사 양성이고 TB-PCR 음성인 2예는 NTM으로 나타났고, 1예

**Table 4.** The results of TB-PCR according to culture results in clinical samples

	Specimens	TB-PCR (+)	TB-PCR (-)
Culture (+)	Bronchial washing fluid	56/60 (93.3)	4/60 (6.7)
	Sputum	3/3 (100)	0 (0.0)
	Body fluids	2/4 (50.0)	2/4 (50.0)
Culture (-)	Bronchial washing fluid	79/474 (16.7)	395/474 (83.3)
	Sputum	11/100 (11.0)	89/100 (89.0)
	Body fluids	7/166 (4.3)	159/166 (95.7)

**Table 5.** Sensitivity and specificity of TB-PCR according to culture results

Specimens	Sensitivity	Specificity
Bronchial washing fluid	93.3% (56/60)	83.3% (395/474)
Sputum	100% (3/3)	89.0% (89/100)
Body fluids	50% (2/4)	95.7% (159/166)

는 검체부적합이며, 배양검사 6예는 모두 결핵으로 나타났다. 이는 단일 검체로 검사를 실시하지 않고 각각 분주하여 온 검체로 검사를 실시하여 검체 내용물의 차이로 인한 것으로 생각된다.

본 연구에서 제한점은 한 검체로 도말검사와 배양검사, TB-PCR 검사를 동시에 실시한 것이 아니라는 점이다. 기관지세척액의 경우는 각 병실 및 외래에서 각각 채취 후 도말검사용, TB-PCR 용, 검체의 내용물이 일정치 않거나, 양이 적은 경우가 있어 재검 후 양성을 나타낸 경우가 3예가 있었다. 객담의 경우도 각각 다르게 채취하여 보내오는 경우가 많아 객담 질은 각각 다를 수밖에 없었다. 또한 임상검체로 의뢰된 대상자의 결핵진단유무를 전부 확인하지 못한 점이다. 이와 같이 TB-PCR은 검체량과 그 정도를 잘 확인하여야 하며, 항산균 도말검사 결과와 조직학적 소견, 질병명 등을 참고해야 하며, 음성인 검체에 대한 분석과 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

결핵 진단을 위한 임상검체인 객담 및 기관지 세척액과 각종 체액 검체로 TB-PCR 자동분석기를 이용한 검사의 유용성을 알아 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 배양검사와 항산균 도말검사 둘 다에서 음성이 경우 중 TB-PCR 양성은 기관지세척액에서 11.3%, 객담은 7.3%, 각종 체액이 3.6%로 나타났다.

2. 검체별 민감도와 특이도는 배양검사 기준으로 기관지세척액 93.3%와 83.3%, 객담 100%와 89.0%, 각종 체액이 50%와 95.7%로 기관지 세척액과 객담에서는 높은 결과를 보였으나, 각종 체액에서 민감도가 낮은 결과를 나타냈다.

이와 같이 결핵을 진단하기 위한 TB-PCR 자동분석법은 임상검체인 기관지세척액 및 객담에서 매우 유용한 결과를 보였으나 각종 체액은 민감도가 낮아 이에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Bonington A, Strang J, Klapper P, Hood S, Rubombora W, Penny M, Willers R, Wilkins E. Use of Roche Amplicor Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 36:1251-1254, 1998.
2. Field S, Lewis S. Intestinal and peritoneal tuberculosis In: Rom WN, Garay WN, eds. Tuberculosis. 2nd ed

p523-547, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004.

3. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. WHO Report, 2004.
4. Hamer DH, Gorbach SL. Infectious diarrhea and bacterial food poisoning. In: Feldman M, Fridman LS, Sleisenger MH, eds. Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease. Volume 2. 7th ed. p1899-1901, Saunders, Philadelphia, 2002.
5. Mitarai S, Shishido H, Kurashima A, Tamura A, Nagai H. Comparative study of Amplicor Mycobacterium PCR and conventional methods for the diagnosis of pleuritis caused by mycobacterial infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 4:871-876, 2000.
6. Piersimoni C, Scarparo CI. Relevance of Commercial Amplification Methods for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples. *American Society for Microbiol* 41(12): 5355-5365, 2003.
7. 국립보건원 & 대한결핵협회 결핵연구원 결핵환자 신고현황 연보 2002.1 & 2002.12:국립보건원 & 대한결핵협회연보, 2003.
8. 김창선, 손형대, 박미란, 서지영, 조동일, 류남수. 내원 시 항산균도말검 사상 음성인 환자에서 실시한 PCR 검사방법의 유용성에 대한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 44(5):1001-1010, 1997.
9. 박문환, 최춘한, 김남진. 폐결핵에 있어서 기관지폐포 세척액 결핵균검사 및 PCR의 진단적 가치. *결핵 및 호흡기질환* 43(2):128-137, 1996.
10. 유창민, 고원중, 류연주, 전경만, 최재철, 강은해, 서지영, 정만표, 김호중, 권오정, 이장호, 기창석, 이남용. 객담 도말 양성 환자에서 폐결핵 과 비결핵 항산균 폐질환의 구별을 위한 결핵균 PCR 검사의 유용성. *결핵 및 호흡기질환* 57(6):528-534, 2004
11. 이준구, 김영삼, 박재민, 고원기, 양동규, 김세규, 장준, 김성규, 최종락. 객담도말 음성인 폐결핵환자의 기관지세척액에서 Amplicor PCR과 IS6110 PCR의 임상적 유용성에 관한 비교 연구. *결핵 및 호흡기질환* 50(2):213-221, 2001.
12. 이재승, 지현승, 홍상범, 오연목, 임채만, 이상도, 고운석, 김우성, 김동순, 김원동, 심태선. 객담 항산균 도말 양성 환자에서 비결핵항산균과의 감별을 위한 결

핵균 중합효소연쇄반응 검사의 유용성 결핵 및 호흡기 질환 58(5):452-458, 2005.

13. 최철석, 김은아, 이경옥. 임상가검물에서 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균 진단의 평가. 대한미생물학회지 28(5):381-389, 1993