

폐결핵 진단 시 중합효소연쇄반응검사 반복 시행의 의의

¹서남대학교 의과대학 내과학교실, ²전남대학교 의과대학 내과학교실

김수옥¹, 김윤희², 지수영², 반희정², 오인재², 권용수², 김규식², 김유일², 임성철², 김영철²

Significance of Repeated Polymerase Chain Reaction (PCR) Testing for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis

Soo-Ok Kim, M.D.¹, Yoon-Hee Kim, M.D.², Su-Young Chi, M.D.², Hee-Jung Ban, M.D.², In-Jae Oh, M.D.², Yong-Soo Kwon, M.D.², Kyu-Sik Kim, M.D.², Yu-Il Kim, M.D.², Sung-Chul Lim, M.D.², Young-Chul Kim, M.D.²

¹Department of Internal Medicine, Seonam University Medical School, Namwon, ²Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Background: The polymerase chain reaction (PCR) test is important for the confirmatory diagnosis of tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The aim of this study was to analyze the yield of repeated PCR testing in patients with confirmed pulmonary TB.

Methods: The medical records of 130 patients, who had more than two consecutive PCR tests and a *M. tuberculosis*-positive sputum culture from August, 2006 to December, 2007, were retrospectively reviewed for the purposes of this study. A positive TB-PCR test was defined as at least one positive test result.

Results: The cumulative positive PCR test rate was 80% (104/130), with gradually increasing rates of positive findings upon the first, second and third TB-PCR tests with 52.3%, 68.5% and 75.4%, respectively. However, further testing did not increase the positive rate further.

Conclusion: Repeated PCR testing at least three times for *M. tuberculosis* is helpful for diagnosis of pulmonary TB.

Key Words: Polymerase Chain Reaction; Tuberculosis; Sputum

서론

폐결핵이 의심되는 환자의 호흡기 검체에서 빠르고 정확하게 결핵균을 동정하는 것은 결핵의 진단은 물론 적절한 치료에 도움이 되며 이는 조기치료를 시작함으로써 결핵균의 전파를 막는 데 매우 중요하다. 현재 항산균 도말과 결핵균 배양 검사가 폐결핵 진단에 가장 중요한 검사로 이용되고 있으나, 항산균 도말 검사는 민감도가 낮고 비결

핵성 마이코박테리움에 의한 감염증을 감별할 수 없으며 결핵균 배양 검사는 배양 기간이 3주 이상이 소요되기 때문에 조기 진단과 치료에 어려움이 있다¹.

최근 폐결핵 진단에 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 검사가 이런 고전적인 진단 방법에 보완적으로 사용되고 있으며 객담배양 양성 환자의 경우 그 민감도와 특이도가 높다고 알려져 널리 이용되고 있다^{2,3}. 그러나 결핵균 PCR은 항산균 도말 검사에 비해 비용이 많이 들기 때문에 2008년 결핵 진료 지침⁴에 따르면 PCR을 통한 검사는 아직까지는 항산균 도말 검사나 배양을 대체할 수는 없고 보조적인 진단 방법으로만 인정받고 있다. 그러나 높은 민감도 및 특이도, 또한 빠른 검사 시간으로 미루어 폐결핵의 빠른 진단 및 치료에 PCR의 유용성을 충분히 기대해 볼 수 있다.

객담 항산균 도말 검사의 경우 반복적인 검사에 대한

Address for correspondence: In-Jae Oh, M.D.
Department of Pulmonary and Critical Care Medicine,
Chonnam National University Medical School, 8, Hak-dong,
Dong-gu, Gwangju 501-757, Korea
Phone: 82-61-379-7617, Fax: 82-61-379-7619
E-mail: droij@chonnam.ac.kr

Received: May. 3, 2010

Accepted: Jun. 7, 2010

유용성이 잘 연구되어 있어 세 차례 반복 검사를 했을 때 95% 이상의 환자를 진단해 낼 수 있음이 여러 연구를 통해 잘 밝혀져 있다^{3,5,6}. 이와 마찬가지로 PCR의 경우에도 검사 횟수에 따라 PCR 검사의 누적 양성률이 증가할 것으로 기대되지만 과연 얼마나 반복적으로 검사를 시행할 때 그 유용성을 최대화 할 수 있을지에 대한 연구는 거의 미비한 실정이다. 이에 저자들은 연속적인 객담 결핵균 PCR 검사의 양성률을 분석함으로써 반복적인 객담 PCR 검사의 적절한 시행 횟수에 대해 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

2006년 8월부터 2007년 12월까지 전남대 병원에서 객담 배양검사상 결핵균이 증명된 환자 중 객담에서 결핵균 PCR을 2회 이상 시행한 130명을 대상으로 객담 PCR 검사의 시행 횟수에 따른 누적 양성률을 후향적으로 분석하였다.

2. 결핵균 PCR 방법

1) 객담 검체에서 핵산을 추출하는 방법

PCR을 시행할 객담 검체는 4% NaOH를 첨가하여 객담을 풀어주고 500 μ L를 취하여 50 mL 튜브에 옮겨 담고 인산염 완충액(phosphate buffer, Na_2HPO_4)을 넣어 잘 섞었다. 이후 10분 동안 2,400 rpm으로 원심분리를 시행 후 상층액을 버리고 남은 침전물에 1.5 mL의 lysis buffer를 넣고 잘 섞어 12,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하였다. 이후 상층액을 버리고 남은 침전물에 50 μ L의 lysis buffer를 넣은 다음 잘 섞고 100°C로 15분간 가열하였다. 이 검체를 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 PCR에 사용하였다.

2) PCR 방법

결핵균 PCR을 위해 insertion sequence (IS6110)의 특정 부위만을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 primer를 이용하였으며, 특이도를 높이기 위해 nested PCR 검사를 시행하였다. 1st PCR primer (5-GGTTTGCGGTGGGGTGTTCGAGTCGATCTGC, 5-TCCTGCGAGCGTAGGCGTCGGTGACAAAGG)와 nested PCR을 위한 2nd PCR primer (5-AACTCAAGGAGCACATCAGC, 5-GTTTGGTCATCAGCCGTTTCG)를 사용하였고, reactive buffer는 10 mM dNTP, 1.5 mM MgCl_2 , 40 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.3)으로 구성되어 있다. 객담 검체에서 추출한 DNA 3 μ L를 가하고 잘 섞어준 뒤 5초간 원심분리 한 후 2.5 U taq

polymerase를 넣어 PCR을 시행하였다. PCR cycle은 94°C에서 20초간 pre-denaturation 후 67°C에서 4초간 결합(annealing), 72°C에서 15초간 신장(elongation)을 하였고 94°C에서 4초간 열변성(denaturation), 72°C에서 30초간 post-elongation을 한 cycle로 하여 40 cycle을 시행하였다. 첫 번째 PCR이 끝난 후 두 번째 PCR 용기에 첫 번째 PCR 검체를 3 μ L를 가하고 두 번째 PCR을 첫 번째와 동일한 방법으로 실시하였다. PCR 산물 15 μ L와 gel loading buffer 3 μ L를 혼합하여 2% agarose gel에 분주하여 100 V의 직류로 30분간 전기영동 시켰다^{2,7,8}.

3. 분석방법

결핵균 PCR을 2회 이상 시행하였던 연구대상 중 1회 이상 양성을 보이는 경우를 양성군으로 분류하였고, 시행 횟수에 따른 누적 양성률을 구하였다. 시행횟수에 따른 누적 양성률의 증가가 통계적 유의성이 있는지 확인하기 위해 이항분포검정(binomial test)을 시행하였으며, 통계 처리는 SPSS for windows 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

결 과

대상 환자는 남자 78명(60%), 여자 52명(40%)이었으며, 평균연령은 54.3 \pm 20.9세였다. 대상 환자 중 객담이 있었던 환자는 65명(50%)이었고 기침을 호소하는 환자는 78명(60%)이었으며 호흡곤란은 29명(22.3%)에서 호소하였다. 흉부 X-선 촬영상 공동을 가지고 있는 환자는 37명(28.5%), 상엽 혹은 하엽을 침범하는 침윤성 병변을 가지고 있는 환자는 64명(49.2%)이었다.

전체 결핵균 PCR 양성률은 130명 중에 104명으로 80%였다. 이 중 첫 번째 시행한 PCR에서 양성인 환자는 68명(52.3%)이었고, 두 번째 PCR에서 양성을 보인 환자까지 포함하였을 때는 89명(68.5%)이었으며, 세 번째 PCR 양성 환자까지 포함하였을 때는 총 98명(75.4%)이었다. 4회부터 8회까지 반복해서 PCR을 시행하였을 때는 누적 양성률이 75.4%에서 80.0%로 4.6% (6명) 증가하였다. 8회 이후에는 누적 양성률이 증가하지 않았다(Table 1).

PCR 시행 횟수가 증가함에 따라 누적 양성률의 증가가 통계적으로 의미가 있는지 알아보기 위해 이항검정을 시행하였다(Figure 1). 1회의 양성률 52.3%와 2회 누적 양성률 68.5%는 통계적으로 유의하였고($p < 0.001$), 2회째 누적 양성률과 3회째 누적 양성률 75.4%는 유의 수준에 근

Table 1. Cumulative positive rate of repeated polymerase chain reaction (PCR) testing

Trial times	No. of participants (persons)	Positive frequency (persons)	Cumulative positive frequency (persons)	Cumulative positive rate (%)
1	130	68	68	52.3
2	130	21	89	68.5
3	97	9	98	75.4
4	61	0	98	75.4
5	45	3	101	77.7
6	27	1	102	78.5
7	17	0	102	78.5
8	11	2	104	80.0
9	10	0	104	80.0
10	8	0	104	80.0
11	4	0	104	80.0

Table 2. Cross table of polymerase chain reaction (PCR) results by AFB stain results

	Negative in AFB stain	Positive in AFB stain	Total
Negative in PCR	22 (31.4)	4 (6.7)	26 (20.0)
Positive in PCR	48 (68.6)	56 (93.3)	104 (80.0)
Total	70 (100.0)	60 (100.0)	130 (100.0)

Values are presented as number (%).

환자는 56명으로 93.3%의 양성률을 보이고 있었다. 객담 항산균 도말 검사에서 음성인 환자 70명 중 PCR에서 양성 을 보인 경우는 48명으로 68.6%이었다(Table 2).

고 찰

폐결핵의 유병률은 매년 꾸준히 감소하여 방사선촬영 상 활동성 결핵은 1965년 5.1%에 달하던 것이 2006년 조사⁹에 따르면 0.5%까지 감소하였다. 폐결핵의 인구 10만 명당의 발생률도 감소 추세를 보이고 있으며, 특히 신규 폐결핵 발생자에 대한 연도별 변화에서 젊은 연령층의 발생률이 감소하고 있어, 우리나라의 폐결핵 발생은 전반적으로 감소할 것으로 보인다. 하지만 2006년 사망원인 통계연보에 따르면 결핵으로 인하여 인구 10만 명당 5.2명이 사망에 이르고 있어 여전히 국내 보건 문제에 중요한 부분을 차지하고 있다.

결핵은 전염성을 가지고 있어 진단과 치료가 늦어질 경우 또 다른 환자의 발생을 야기하므로 조기진단과 치료가 중요하다. 폐결핵의 진단 방법으로 현재까지 특이도가 가장 높은 검사는 객담 등의 검체에서 결핵균을 배양하는 것이다¹. 폐결핵 배양 검사는 항산균 도말 검사 양성 환자 중 비결핵성 마이코박테리움에 의한 감염증을 감별을 할 수 있고 약제 내성 검사를 할 수 있으며, 약물 감수성 검사를 시행할 수 있는 장점을 가지고 있지만 *Mycobacterium tuberculosis*를 포함한 대부분의 Mycobacteria 종은 성장 속도가 느려 4~8주의 배양 기간이 필요하여 조기 진단이 어렵다. 실제 객담의 항산균 도말 검사의 민감도 및 특이도를 파악하기 위해 727명을 대상으로 한 Levy 등의 전향적 연구¹⁰ 결과 민감도는 53.1%, 특이도는 99.8%였다. 항산균 도말 검사의 민감도는 조건에 따라 달라질 수 있는데 특히 전염성이 높은 환자와 같이 객담에 포함된 결핵균이 많은 경우나 효과적인 객담 배출을 할 수 있는 환자의 경

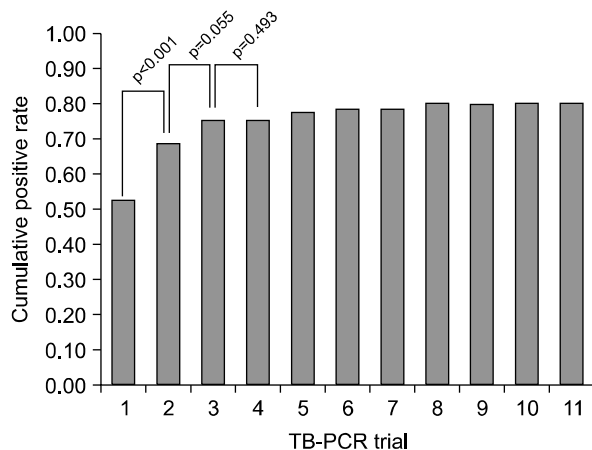


Figure 1. Statistical analysis by binomial test. Trends of cumulative positive rate by number of tuberculosis-polymerase chain reaction (TB-PCR) trials. Difference with cumulative positive rate by trial times were verified by the binomial test. The difference in the rates between the first and second trials was significant ($p < 0.001$), the difference between the second and third trials was borderline significant ($p = 0.055$), whereas the difference between the third and fourth trials was statistically insignificant.

접한 수준($p = 0.055$)이었으나, 3회와 그 이후 누적 양성률은 통계적으로 차이가 없었다.

객담 항산균 도말 검사에서 양성을 보인 환자는 130명 중 60명으로 전체 환자의 46.2%였다. 객담 항산균 도말 검사에서 양성을 보인 환자 60명 중 결핵균 PCR 양성인

우 항산균 도말 검사의 민감도는 높아진다. 그러나 객담 배출량이 적은 임상 양상을 가진 환자나 검체를 얻기 힘든 소아 또는 여성 환자의 경우 항산균 도말 검사의 민감도는 낮아질 것이고 낮은 민감도로 인해 상당한 수준의 위음성 환자가 있을 수 있는데, 실제 격리가 제때 이루어지지 못하기 때문에 전염성이 낮고 균이 적게 나온다고 하더라도 객담 음성 결핵환자에 의해 전파되는 결핵이 전체의 17%를 차지한다는 보고가 있다¹¹.

최근 분자생물학에서 광범위하게 사용되고 있는 PCR 기술은 1984년 Kary Mullis¹²가 발전시킨 이래 객담 검체에서 결핵균을 진단하는 데에도 적용되었다. Brisson-Noel 등이 처음 보고한 이후 PCR은 결핵의 조기 진단 및 비결핵성 항산균 폐질환과의 감별에 상용화되고 있다^{3,12-14}. 최근 항산균 도말 검사와 흉부 X-선 촬영을 통해 폐결핵의 조기 진단을 하는 방법과 PCR을 통해 진단하는 방법을 비교한 연구에 따르면 전자의 민감도와 특이도가 92%와 66%인데 비해 PCR의 민감도와 특이도는 93%와 84%에 해당하여 PCR의 특이도가 고전적인 진단 방법에 비해 높음이 증명되었다¹⁵. 하지만 결핵균 PCR검사는 항산균 도말 검사에 비해 비용이 많이 들기 때문에 아직까지는 보조적인 진단 방법으로만 인정받고 있으나 그 효용성이 광범위하게 증명되면 기존의 검사와 함께 표준적인 검사에 포함되어 폐결핵 진단의 정확성을 더욱 증가시킬 것으로 기대된다. 이를 위해 중요한 것이 최고의 민감도를 얻기 위해 몇 번의 반복 검사가 필요한지에 대한 연구이다. 항산균 도말 검사의 경우 3번까지 반복 시행했을 때 그 진단적 가치가 있다고 합의되어 있으나¹⁶, 결핵균 PCR의 경우에는 과연 몇 번을 반복을 했을 때 그 진단적 가치를 높일 수 있을지에 대해서는 아직 확실히 정립된 바가 없다.

본 연구는 배양검사상 결핵균이 동정되어 폐결핵으로 확진된 환자에서, 객담 결핵균 PCR을 반복한 횟수에 따른 민감도를 비교함으로써 PCR의 적합한 반복 시행 횟수에 대한 근거자료를 제시하는 데 있다. 본 연구에서 결핵균 PCR 검사는 2회까지는 누적 양성률을 통계적으로 의의 있게 상승시키고, 4회 이상 시행하는 것은 결핵 진단율을 높이는 데 큰 도움이 되지 않는다는 결론을 내릴 수 있었다. 결핵 배양 검사에서 결핵균이 동정된 전체 130명의 환자 중에 결핵균 PCR 양성군은 104명으로 전체적인 양성률은 80%였다. 이러한 결과는 이전 결핵균 PCR의 양성률에 관한 Park 등의 연구¹⁷에서 민감도가 79.2%를 보였던 것과 일치하는 결과이다. 본 연구에서 PCR을 최대 11회까지 시행하였으나 8회 이후에는 추가로 양성을 보이는

환자는 없었다. 또한 3회까지는 누적 양성률의 증가가 있었으나 4회에서 8회까지 시행하였을 경우 추가로 확인된 양성률은 4.6%에 불과하였다. 따라서 결핵균 PCR의 경우 3회를 초과하여 반복적인 검사를 하는 것은 비용-효과면에서 적절하지 않다고 판단된다.

최종적으로 결핵 환자로 확진된 130명 중 객담 항산균 도말 검사에서 음성을 보인 환자는 70명이었다. 이 중 68.6%에 해당하는 48명은 PCR 검사에서 양성 소견을 보였는데, 이는 객담 항산균 도말 검사에서 음성을 보여 진단에서 누락된 사람이 결핵균 PCR 검사를 통해 68.6% 정도가 진단될 수 있음을 의미하는 것이다. 반면에 항산균 도말 검사에서 양성이었음에도 불구하고 PCR에서 6.7%가 음성으로 확인되었는데 이는 위음성일 가능성을 시사하는 것이다. PCR 검사의 위음성은 검체 내에 포함되는 균의 수가 적거나 검체 내에 억제제가 존재하는 것이 원인으로 알려져 있으며 이 부분에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다¹⁸. 또한 본 연구에서는 결핵 배양 양성군만을 대상으로 하였기 때문에 위양성에 대해 분석을 할 수는 없었지만 결핵균 PCR을 시행함에 있어서 Beige 등¹⁹의 연구에 의하면 오염에 의해서 위양성이 가능하다는 것이 알려져 있다.

폐결핵 진단에 있어 PCR의 역할에 대한 지금까지의 연구는 환자군과 대조군에서 민감도나 특이도를 비교하는 연구 논문이 주를 이루었다. 이 때 PCR은 주로 3회까지 검사를 진행하였고 횟수를 3회 이상 시행하여 비교한 논문을 찾기는 어려웠으나 이 연구의 경우에는 최대 11회까지 PCR을 반복 시행하여 누적 양성 예측도를 비교하였다. 그러나 이 연구가 후향적이었기 때문에 대상자 간에 PCR 시행 횟수의 변이가 있고, 검사 간의 간격이 다소 불규칙하였으며, 객담 채취 방법의 표준화가 엄격하게 지켜졌다고 할 수 없어 연구의 내적 신뢰도를 저하시키는 요인으로 고려될 수 있다. 또한 배양검사를 통해 최종적으로 결핵이 확인된 환자군만을 대상으로 하여 결핵균 PCR의 특이도는 확인하지 못하였다. 추후 결핵 의심환자의 선별, 증상과 상황에 따른 검사기준의 마련, 검체 채취의 질 관리, PCR 시행간격에 대한 표준화 등 연구의 신뢰도를 향상시켜 전향적 연구를 시행한다면 PCR의 검사의 횟수에 대한 보다 명확한 기준을 마련할 수 있을 것으로 기대된다. 또 현재 객담 PCR 검사가 진단 지침에서 사용되지 않고 있는 중요한 요인인 비용-효과적인 면에 대한 분석이 함께 시행된다면 결핵 진단 시 객담 PCR 검사를 시행하는 것에 대한 지침을 세우는 데 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
2. Cheng VC, Yam WC, Hung IF, Woo PC, Lau SK, Tang BS, et al. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol* 2004;57:281-5.
3. Laifer G, Widmer AF, Frei R, Zimmerli W, Fluckiger U. Polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*: impact on clinical management of refugees with pulmonary infiltrates. *Chest* 2004;125:981-6.
4. Korea Centers for Disease Control and Prevention, Korean Institute of Tuberculosis. Guidelines for the control of tuberculosis 2008. Seoul: Korea Centers for Disease Control and Prevention, Korean Institute of Tuberculosis; 2008.
5. Mase SR, Ramsay A, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Cunningham J, et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:485-95.
6. Al Zahrani K, Al Jahdali H, Poirier L, Rene P, Menzies D. Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:855-60.
7. Yam WC, Yuen KY, Seto WH. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens using an automated DNA amplification assay and a single tube nested polymerase chain reaction (PCR). *Clin Chem Lab Med* 1998;36:597-9.
8. Suh SP, Huh Y, Kee SJ, Shin JH, Ryang DW. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nested polymerase chain reaction. *Korean J Clin Pathol* 1995;15:61-73.
9. Kim HJ. Current situation of tuberculosis and its control in Korea. *J Korean Med Assoc* 2006;49:762-72.
10. Levy H, Feldman C, Sacho H, van der Meulen H, Kallenbach J, Koomhof H. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1989;95:1193-7.
11. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999;353:444-9.
12. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003;226:3-6.
13. 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* 1989;2:1069-71.
14. Tueller C, Chhajed PN, Buitrago-Tellez C, Frei R, Frey M, Tamm M. Value of smear and PCR in bronchoalveolar lavage fluid in culture positive pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 2005;26:767-72.
15. Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 2004;42:1012-5.
16. Ozkutuk A, Terek G, Coban H, Esen N. Is it valuable to examine more than one sputum smear per patient for the diagnosis of pulmonary tuberculosis? *Jpn J Infect Dis* 2007;60:73-5.
17. Park SS, Kwak KR, Hwang JY, Yun SM, Ryue CC, Chang CH, et al. Clinical utility of amplified mycobacterium tuberculosis direct test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* 1999;47:747-56.
18. Carpentier E, Drouillard B, Dailloux M, Moinard D, Vallee E, Dutilh B, et al. Diagnosis of tuberculosis by Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multi-center study. *J Clin Microbiol* 1995;33:3106-10.
19. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, et al. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:90-5.