

결핵 진단을 위한 검사 방법간의 효율성에 관한 비교 분석

지산대학교 임상병리과, 동의의료원 임상병리과*, 인제대학교 임상병리학과**,
부경대학교 미생물학과***

최석철† · 정천환* · 성희경** · 김태운 · 이원재***

국문초록: 최근 다약제 내성균주의 출현과 후천성 면역결핍증으로 인한 결핵발병률의 증가는 전 세계적으로 중요한 보건문제가 되었다. 따라서 보다 빠르고 신뢰할 만한 진단법은 결핵발병을 위한 가장 중요한 필요조건 중의 하나일 것이다. 본 연구는 171명의 환자를 대상으로 폐결핵 진단의 전통적 방법들(X-선, 항산성 염색, 배양)과 PCR법간의 진단적 가치와 효율성을 비교 검토하기 위해 시행하였다. 흉부 X-선 소견 및 검사 결과 그리고 다른 임상 소견들을 통해 결핵으로 확진된 예는 전체 171건의 검체 중 39예(22.8%)였다. 이러한 확진을 근거로 할 때 각 검사별 민감도, 특이도, 효율성, 위양성률, 위음성률을 살펴보면 흉부 X-선의 경우 각각 69.2%, 87.1%, 83.0%, 12.9%, 30.8%; 항산성 염색의 경우 79.9%, 95.5%, 91.8%, 4.6%, 20.5%; 배양의 경우 56.4%, 99.2%, 89.5%, 0.8%, 43.6%; PCR의 경우 82.1%, 96.2%, 93.0%, 3.8%, 17.9%였다. PCR의 경우 가장 높은 민감도 및 효율성과 가장 낮은 위음성률을 보였다. 배양법은 가장 높은 특이도와 가장 낮은 위양성률을 보였다. 결론적으로 PCR은 결핵 진단을 위한 신속하고 효율적인 우수한 검사 방법이므로 일상적 임상 검사사의 활용가치가 매우 높다고 하겠다. 그러나 전통적인 여러 방법들 역시 임상상황에 따라 그 나름대로의 특별한 가치를 지니고 있으므로 철저한 정도관리를 통해 PCR과 병행한다면 결핵균 검출율을 보다 높일 수 있으리라 판단된다.

서 론

*Mycobacterium tuberculosis*의 감염에 의해 발병되는 만성적 소모성 질환인 결핵은 1882년 Robert Koch에 의해 최초로 원인균이 발견된 이래 인류는 이 질환의 박멸을 위해 꾸준한 노력을 기울여 왔다. 그러나, 최근 들어 다약제 내성균주의 출현과 후천성 면역결핍증(AIDS)으로 인해 결핵의 폭발적 증가를 보임에 따라 인류는 다시 이 질병으로부터 심각한 위협을 받게 되었고 전세계적인 보건문제로 다시 대두되게 되었다. 전인류의 약 1/3에 해당하는 17억 인구가 결핵에 감염된 경험이 있거나 현재 앓고 있으며 이중 약 2천만명이 활동성 결핵 환자로 추정된다³⁴⁾. 우리나라의 경우 결핵 감염율은 32.3%이고 활동성 폐결핵 유병률은

1.6%로써 활동성 폐결핵 환자 수가 100만명을 훨씬 넘을 것으로 추정되며 이로 인한 연간 사망자 수는 7,000명 이상으로 생각된다¹⁴⁾.

일반적인 폐결핵의 진단 방법으로는 투베르쿨린 피부 반응검사, 흉부 X선 촬영, 객담이나 기관지 세척액의 항산성균 도말 염색법, 배양법 등을 들 수 있는데, 이 방법들은 결핵의 임상 진단법으로서의 유용성과 함께 한계점 역시 가지고 있다. 이와 같은 전통적 결핵 진단법의 단점을 보완하고 보다 향상된 방법의 개발을 위해 많은 연구자들이 지속적인 노력을 기울인 결과, 분자생물학적 기법을 활용한 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 표현)이라는 획기적 방법을 임상에 도입하게 되었다^{26,31)}. PCR은 이론적으로 검체내에 단 1개의 결핵균만이 존재해도 검출이 가능하며 약 48시간 정도의 짧은 시간내에 확인할 수 있으므로 신속하고 효율적인 진단법으로 인식되고 있다. 그러나 PCR은 검사자의 숙련 정도에 따라 위양성 혹은 위음성의 가능성이 있

* 논문 접수: 1999년 8월 9일

수정재접수: 1999년 9월 20일

† 별책 요청 저자

으며²²⁾ 살아있는 결핵균 뿐만 아니라 사균 역시 양성으로 나타날 수 있다고 보고됨에 따라¹¹⁾ 기존 방법들과의 임상적 비교 평가가 필요하리라 생각된다. 따라서 저자들은 기존의 결핵 진단법인 X-ray, 객담 도말 항산성 염색 및 배양법과 PCR 성적간의 상호 비교 분석을 통해 어떤 방법이 특이도와 민감도가 더 우수한지, 그리고 보다 효율성이 높은지를 규명하여 향후 결핵 진단 및 관리를 위한 참고자료로 활용하기 위해 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. PCR용 표준균주

표준균주는 PCR 양성 대조용으로 *M. tuberculosis* H37Rv를, 음성 대조용으로는 *M. avium* (ATCC 19704), *M. intracellulare* (ATCC 1359), *M. kansasii* (ATCC 12478)를 결핵연구원으로부터 공급받았다.

2. 대상 환자 및 임상검체

1997년 1월부터 동년 6월까지 D 대학 부속병원 임상병리과 미생물검사실로 의뢰된 검체 중 171건의 객담검체만을 연구재료로 채택하였으며, 검체를 채취한 대상 환자들은 폐결핵이 의심되거나 이미 폐결핵 환자로 판명되어 항결핵제제를 투여 중인 환자들이었다.

3. 객담채취 및 처리

모든 대상 환자들로부터 아침 공복 상태에서 5 ml 이상의 객담을 전용용기에 받아 즉시 처리함을 원칙으로 하였다. 검체는 항산성 염색용과 배양액 및 PCR용을 각각 따로 채취하였다. 객담은 4% KOH를 동일량으로 넣고 37°C에서 30분간의 소화 후 3800 rpm (2421 g)에서 10분간 원침시킨

뒤 상층액을 버리고 침전물로 항산성 염색과 배양을 하였으며 PCR용 검체는 따로 처리하였다.

4. 항산성 염색 및 검경

염색 방법은 Ziehl-Neelsen법으로서 carbolfuchsin 염색액으로 1차 염색 후 acid-alcohol로 탈색한 뒤 methylene blue 용액으로 대조 염색을 시행하였다. 이렇게 염색한 도말 슬라이드를 잘 숙련된 2명의 검사요원으로 하여금 현미경적 관찰을 하게 했고 1개의 슬라이드당 적어도 300시야 이상 10분~15분간의 관찰을 원칙으로 하였다. 검경 결과의 판정은 CDC (Centers for Disease Control)의 기준에 따라 소수 (rare, 1+; 전시야 중 3~9개의 acid-fast bacilli), 중등도 (a few, 2+; 전시야 중 10개 이상의 AFB), 다수 (numerous, 3+; 매시야 마다 1개 이상의 AFB) 등으로 표시하고 1+ 이상을 결핵양성 검체로 판정하였다.

5. 균의 배양

4% KOH로 소화 침전시킨 침사액을 Lowenstein-Jensen 배지 사면에 흘려 집중한 후 37°C에서 8주 동안 배양했으며 매 1주마다 균성장 유무를 확인하였다. 배지상에서 일단 집락이 형성되면 결핵균과 유사균들간의 감별을 위한 생화학적 검사를 실시하였다 (Table 1).

6. Oligonucleotide primer의 합성

PCR primer는 392 DNA/RNA 합성기 (Applied Biosystem, USA)를 이용하여 합성하였으며 *M. tuberculosis*와 특이성을 가지며 결핵균 한 개체당 10~16번 반복 존재하는 것으로 알려진 IS6110 유전자 부위에서 선택하였다. 1차 PCR을 위한 primer로는 TB1 (561-580), TB2 (865-884)를 사용하였고, nested PCR을 위해서는 TB4 (805-826)를 사용하였다.

Table 1. Biochemical tests for differential identification between *M. tuberculosis* and other mycobacterial species

Test	Species			
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. microli</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>
Urease	+	+	+	+
Nicotinamide	+	+	+	-
Nitrate reduction	+	-	-	-
Heat-stable Catalase	-	-	-	-
Niacin	+	+	-	-

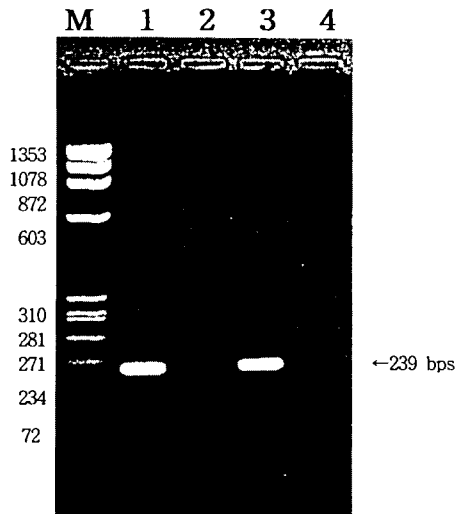


Fig. 1. Results of polymerase chain reaction of *M. tuberculosis* DNA with specific primers based on IS6110 sequence. M: molecular standard marker (ϕ X174/*Hae* III), Lane 1: positive control, Lane 2: negative control, Lane 3: positive patient control, Lane 4: negative patient control.

7. DNA의 추출 및 PCR에 의한 DNA 증폭

DNA 추출은 guanidinium thiocyanate/silica (Gu-SCN)법을 이용하였다. 1.5 ml tube에 세포 용해 완충액 (0.1 M Tris-HCl, pH 6.4, 10 M GuSCN, 0.2 M EDTA pH 8.0, Triton X-100) 40 μ l와 검체 50 μ l를 넣어 혼합한 후 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열하였다. 가열한 후 12% silica dioxide 용액 40 μ l를 혼합하여 10분간 실온에서 방치하여 냉각시킨 뒤 12,000 g에서 15초 동안 원심분리시켰다. 그 후 상층액을 제거한 뒤 침전물에 세포용액을 1 ml 정도 넣고 부유시켜 2회 세척하고, 70% cold ethanol로 2회, acetone으로 1회 처리한 후 60 $^{\circ}$ C에서 건조시켰다. 완전히 건조된 용기에 3차 증류수 1 ml를 넣고 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 silica 입자와 결합된 DNA를 용출하였다. 완전히 용출이 끝난 후 12,000 g으로 2분간 원심분리시키고, 상층의 용액을 PCR에 사용하였다. PCR 반응의 최종량은 20 μ l로 하였으며 Taq polymerase와 검체 DNA를 제외한 모든 반응액의 성분 (20 pM primer, 0.2 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100)은 실험조건에 동질성을 위해 사전에 제조하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 이때 사용한 primer는 IS6110 단편 유전자에서 유래된

239 bp (19 kD primer로 함)를 증폭하는 oligonucleotide (5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGTCGGT-3', 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCG-3') 한 쌍을 사용하였다. PCR 반응의 확인을 위하여 증폭된 DNA에 2 μ l의 loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol)를 넣은 다음 2% agarose gel에 100 volt로 30분간 전기영동시킨 후 ethidium bromide로 염색하여, 1차 PCR에서는 324 bp, nested PCR에서는 239 bp 크기의 DNA band를 확인하였다 (Fig. 1).

8. 폐결핵 환자의 판정기준

폐결핵 환자로의 판정기준은 X-ray 결과, 도말 염색법, 배양법, 혹은 PCR 검사상에서 양성인 나온 환자들로 하되, 이러한 진단 방법들에서 설령 음성반응이 나왔더라도 여러 가지 임상 증세나 소견 등을 면밀히 검토하여 임상 전문가가 결핵 환자로 최종 판단을 하였다. 또한 전술한 여러 검사상에서 양성반응이 나왔더라도 반복적인 검사를 통해 신중히 진단을 내렸다. 단 연구 대상자 중 과거에 결핵을 앓았으나 완치된 경우는 비결핵 환자군으로 분류하였다.

결 과

1. 폐결핵 환자 수

전술한 진단기준과 여러 임상 증세 및 소견에 근거하여 임상 전문가에 의해 폐결핵으로 판명된 예는 전체 171건의 검체 중 39예로서 약 22.8%를 차지하였다. 폐결핵 환자의 남녀 성비는 여자 환자 14예, 남자 환자 25예로써 남자의 비율이 훨씬 높았으며 평균 연령은 여자의 경우 약 60세 (최저 29세~최고 84세), 남자의 경우엔 약 45세 (최저 19세~최고 78세)였다.

2. 각 검사 성적간의 비교 분석

총 171건의 검체에 대한 각 검사 결과 및 항목별 민감도, 특이도, 그리고 효율성은 Table 2와 같다. 결핵 환자군으로 최종 분류된 39건의 검체에 대한 흉부 X-선 판독 결과는 양성반응이 27예 (69.2%), 음성반응 (위음성)이 12예 (30.8%)로써 민감도가 69.2%였다.

항산성 염색의 경우, 39예의 결핵 환자 중 31예가 양성 (79.5%), 8예가 음성 (위음성, 20.5%)으로써 민감도는 79.5%였다. PCR의 경우 결핵 환자 39예

Table 2. Comparison of sensitivity, specificity and efficiency among various clinical methods for diagnosis of tuberculosis

	X-ray		AFB stain		Culture		PCR	
	A	NA	+	-	+	-	+	-
TB cases (n=39)	27	12	31	8	22	7	32	7
Non-TB cases (n=132)	17	115	6	126	1	131	5	127
Sensitivity (%)	69.2		79.5		56.4		82.1	
Specificity (%)	87.1		95.5		99.2		96.2	
Efficiency (%)	83.0		91.8		89.5		93.0	
False positive (%)	12.9		4.6		0.8		3.8	
False negative (%)	30.8		20.5		43.6		17.9	

Legend: A, active; NA, non-active; AFB, acid-fast bacilli; TB, pulmonary tuberculosis

Table 3. Comparative analysis among results of various diagnostic methods in 39 cases of tuberculosis patients

X-Ray	AFB stain	Culture	PCR	Number of case	Percentage (%)
+	-	-	-	1	2.6
-	-	-	+	1	2.6
+	+	-	-	1	2.6
-	+	+	-	2	5.1
+	-	-	+	6	15.4
-	+	-	+	1	2.6
+	+	-	+	7	17.9
+	+	+	-	3	7.7
-	+	+	+	8	20.5
+	+	+	+	9	23.1
Total				39	

중 32예가 양성 (82.1%), 7예가 음성반응 (위음성)을 나타내어서 (17.9%) 민감도는 82.1%였다. 배양의 경우 결핵 환자 39예 중 22예가 양성 (56.4%), 17예가 음성 (위음성) 결과를 보여 (43.6%) 민감도는 56.4%였다. 전체 검체 중 비결핵 환자군으로 확진된 132예에 대한 각종 검사 성적을 비교 검토해 본 결과, 흉부 X-선은 115예가 양성 (87.1%), 12예가 양성 (위양성, 9.1%)을 보여서 특이도는 87.1%였고, 항산성 염색 결과는 126예가 음성 (95.5%), 6예가 양성 (위양성, 4.6%)으로써 특이도는 95.5%

였고, PCR 결과는 127예가 음성 (96.2%), 5예가 양성 (위양성 3.8%)으로써 특이도가 96.2%였고, 배양 결과는 131예가 음성 (99.2%), 1예가 양성 (위양성, 0.8%)으로 나타나 특이도는 99.2%였다. 각 검사 방법에 대한 효율성을 보면 흉부 X-선이 83.0%, 항산성 염색법이 91.8%, PCR이 93.0%, 배양법이 89.5%로 각각 나타났다. 그리고 각 검사 방법에 있어 위양성 발생률 및 위음성 발생률은 X-ray의 경우 12.9% 및 30.8%, 항산성 염색의 경우 4.6% 및 20.5%, PCR은 3.8% 및 17.9%, 배양의 경우 0.8% 및 43.6%였다. 따라서 민감도가 높은 순서로 나열하면 PCR>항산성 염색>X-ray>배양 순이고, 특이도는 배양>PCR>항산성 염색>X-ray 순이고, 효율성은 PCR>항산성 염색>배양>X-ray 순이며, 위양성률은 X-ray>항산성 염색>PCR>배양, 위음성률은 배양>X-ray>항산성 염색>PCR의 순서로 나타났다.

3. 폐결핵 환자의 검사 성적에 대한 비교 분석

전체 39예의 폐결핵 환자들 중 X-ray에서만 양성인 경우는 1예, PCR에서만 양성인 경우 1예, X-ray와 항산성 염색에서만 양성으로 나타난 경우는 1예, X-ray와 PCR에서만 양성을 보인 환자는 6예, 항산성 염색과 PCR에서만 양성인 환자는 1예, 항산성 염색과 배양에서만 양성을 보인 환자는 2예, X-ray, 항산성 염색 및 PCR의 3가지 검사에서 양성반응을 보인 경우는 7예였고, X-ray, 항산성 염색 및 배양의 3가지 검사에서 양성을 보인 경우는 3예, 항산성 염색, PCR, 그리고 배양의 3가지 검사

Table 4. Comparison of results of medication group with non-medication group in tuberculosis patients

Parameter	Group	Medication group (n = 26)	Non-medication group (n = 13)
	X-Ray	(+:-)	19 : 7 (73.1%)
AFB stain	(+:-)	21 : 5 (80.8%)	10 : 3 (76.9%)
PCR	(+:-)	20 : 6 (76.9%)	12 : 1 (92.3%)
Culture	(+:-)	12 : 14 (46.2%)	10 : 3 (76.9%)

에서 양성을 나타낸 경우는 8예, X-ray, 항산성 염색, PCR, 그리고 배양 모두에서 양성을 보인 경우는 9예였다 (Table 3).

4. 폐결핵 환자 중 항결핵제 투여군과 비투여군 간의 검사 성적 비교

39예의 폐결핵 환자들 중 항결핵제 투여 환자는 26예, 비투여 환자는 13예로써 각 검사 성적은 Table 4와 같다. 흉부 X-ray에서 양성을 보인 경우는 투여군에서 19예, 비투여군에서 8예, 항산성 염색에서 양성을 보인 경우는 투여군에서 21예, 비투여군에서 10예, PCR에서 양성을 보인 경우는 투여군에서 20예, 비투여군에서 12예, 배양에서 양성을 보인 경우는 투여군에서 12예, 비투여군에서 10예로써 항결핵제 투여군의 경우 항산성 염색법이 양성률이 가장 높았고 비투여군의 경우엔 PCR법이 양성률이 가장 높았다.

5. 비결핵 환자군 중 위양성 반응을 보인 경우

총 171예 중 비결핵 환자군으로 분류된 경우는 132예였으며 이 가운데 어느 한가지 방법에서라도 위양성을 보인 경우는 19예로써 약 14.4%를 점유했다. 이들의 진단명은 이미 과거에 폐결핵을 앓다가 완치되어 폐가 섬유화된 경우가 4예, 폐렴 5예, 기관지 천식증 1예, 기타 9예였다.

고 찰

결핵 진단을 위한 빠르고 특이성 높은 검사 방법은 결핵퇴치의 노력에 있어 가장 중요한 필요 조건 중의 하나일 것이다. 비록 환자의 병력을 토대로 결핵의 추정 진단이 가능하긴 하나, 확진을 위해서는 임상 및 방사선학적 소견 뿐만 아니라 항산성 염색에서 결핵균의 존재 유무 및 배양을 통한 직접적 분리가 필요하다. 결핵의 진단을 위

한 여러 임상 방법 중 방사선학적 소견은 확진법은 아니지만 결핵이 의심될 경우 가장 먼저 시행하게 되는 검사법이다. 결핵의 방사선학적 소견은 매우 다양하여서 거의 모든 종류의 소견이 나타날 수 있다. 그러나 방사선학적 소견만으로 다른 질병과의 완전한 감별이 어렵고 활동성의 판정 역시 곤란한 관계로 그 진단적 한계가 있다⁵⁾. 염색도말을 이용한 항산성균의 현미경적 확인 방법 역시 빠른 진단법의 한가지이긴 하나 객담내에 비교적 많은 양의 결핵균이 있어야 하고 ($>10^4/ml$) 결핵균과 비정형 항산균 모두 양성으로 관찰되어 종간의 확인이 어렵기 때문에 결핵균에만 특이한 염색법은 아니다³²⁾. 뿐만 아니라 도말 항산성 염색법은 특이도는 높지만 100%가 되지 못하며 배양검사 결과와 비교한 민감도는 22~78%로 알려져 있고 비정형 항산균에 의한 감염시 그 민감도는 더욱 낮아진다고 보고된 바 있다^{17,25,33)}.

전통적인 결핵 진단법인 배양은 검체내에 10~100개 이상의 균만 있어도 증식이 가능하므로 민감도가 염색법보다 높고 특이도 또한 100%에 가까우며 균의 약제 감수성 검사 역시 가능하다는 장점을 지니고 있다. 그러나 감염 부위에 소량의 균만이 있을 경우 양성 결과를 얻기 위해서 중복 배양이 필요하며 결핵균의 느린 증식속도 때문에 3~10주의 긴 배양시간이 소요되므로 진단의 지연을 가져와서 임상적인 관점에서 볼 때 결핵치료에 이용되기에는 많은 어려움이 있다⁹⁾. 혈청학적 검사법들이 일부 임상상황에서 유용할 수도 있으나 민감도와 특이도 둘 다 만족스럽지 못했으며 flame ionization detection법인 gas chromatography 역시 민감도가 떨어진다고^{20,23)}. Mass spectrometric detection은 임상검체에서 tuberculostearic acid를 검출하는데 성공적으로 이용되었긴 하나 고가의 장비와 정교하고 복잡한 기술을 필요로 하는 검사법이며 표식특이탐침을 이용한 DNA 혹은 RNA

hybridization test 역시 임상검체에 이용하기엔 그 민감도가 충분치 못하다^{24,30}. 최근 방사선 동위원소를 이용하여 기존의 통상 배양법보다 짧은 시간에 결핵균을 검출할 수 있는 BACTEC[®] system이 개발되어서 임상에 이용되고 있긴 하나, 이 방법 역시 최소 2주 이상의 배양기간이 소요된다¹⁵.

1988년 Saiki 등³¹)에 의한 특정한 DNA를 연속적으로 복제할 수 있는 방법인 polymerase chain reaction (PCR)의 개발은 결핵균을 포함한 미생물 감염 진단을 위한 새로운 가능성을 열어 주었다. PCR의 한 주기는 열변성, 시발체 결합, 그리고 증합반응의 세 단계로 이루어지며 이를 30~40회 반복하여 원하는 DNA를 (1+X)ⁿ 배 증폭시킨다 (X: 증합효소 연쇄반응의 효율 <70~100%>, n: 증폭 주기의 수)^{26,29}). 따라서 이론적으로는 임상검체에서 2 kb의 DNA가 0.09분자만 있어도 검출이 가능하다⁷. PCR에 의한 결핵의 진단은 1989년 Brisson 등¹⁸)이 처음으로 시도하였는데 65 kDa 항원을 coding하는 DNA 중 383 bp의 DNA 분절을 증폭하였다. 결핵균은 약 3,000 kb의 염색체성 DNA를 가지며²¹) 4겹으로 이루어진 세포벽은 약 60%의 지질 성분을 함유하고 있어 다른 일반 세균보다 DNA 추출이 쉽지 않았으나 여러 방법의 개발과 실용화로 인해 오늘날엔 결핵 진단에 있어 PCR의 이용은 거의 일상화되었다. 그러나 Noordhoek 등^{27,28})은 서로 다른 검사실간의 비교 분석을 통하여 PCR의 위양성률이 3~77%까지 매우 다양한 차이를 확인함으로써 재현성과 신뢰도에 문제점이 있음을 지적하였고 국내에서도 기존의 도말 염색법이나 배양법 및 여러 임상결과와 PCR간의 성적 비교를 하여 PCR의 위음성 혹은 위양성 문제를 보고한 바가 있다^{1,2,4,6,11}).

본 연구의 저자들 역시 이와 같은 여러 문헌적 보고를 토대로 결핵 진단의 여러 임상 방법들과 PCR간에 그 성적을 비교 분석하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 흉부 X-선의 경우 민감도는 69.2% (27/39), 특이도는 87.1% (17/132)로써 민감도 보다는 특이도가 훨씬 더 높긴하였으나 다른 검사 방법보다 특이도가 가장 낮았는데 이는 아마 과거 폐결핵을 앓았으나 현재 완치된 환자들에 있어 양성반응을 보인 환자가 보다 많음으로 인한 결과로 생각된다.

도말 항산성 염색의 경우 민감도는 79.5%, 특이도는 95.5%, 효율성은 91.8%로써 기존의 염 등³) 및 전 등⁸)의 보고와는 약간 달랐다. 전자의 경우

민감도와 특이도가 54.2%, 100%였고 후자의 경우 각각 41.8%와 100%의 성적을 보였다. 따라서 본 저자들이 제시한 결과의 특이도와 이들이 보고한 특이도는 유사하였으나 민감도에 있어선 현격한 차이를 보였다. 본 연구에 있어 항산성 염색법의 민감도가 기존의 타 연구보고 보다 훨씬 높은 이유를 분명히 알 수 없었다.

다만 몇 가지 차이점은 본 연구와 전 등⁸)의 연구에 있어 결핵 환자로의 확진 방법이 유사했는데 비해 염 등³)의 경우엔 약간 달라서 항결핵제를 현재 복용중인 환자를 결핵확진에서 제외시켰으며, 이들은 객담의 전처리에 있어 NaOH를 사용하는데 비해 저자들은 4% KOH를 사용하였다. 또한가지의 가능성은 객담검체의 원심분리 속도일 수도 있다. 이들 두 연구의 경우 검체를 약 3,000 rpm에서 원침시킨데 비해 본 연구의 경우 3,800 rpm (2421 g)에서 원침을 시켰다. Richman 등¹⁰)은 결핵균의 분리 배양에 있어 원심분리의 영향을 언급하였는데, 원심력이 1,260 rpm일 때 도말 양성률은 1.8%, 3,000 rpm일 때 4.5%, 그리고 3,800 rpm일때 9.6%로 향상된다고 보고한 바 있다. 따라서 도말 항산성 염색법에 있어 양성률을 높이기 위해서는 검체를 충분한 속도로 원침시키는 것이 보다 바람직할 것으로 판단된다.

최근 일부 임상보고들은^{3,9,19}) 세포원침법을 이용한 개선된 항산성 염색법이 전통적인 항산성 염색법 보다 훨씬 우수한 결과를 가져올 수 있다고 보고함에 따라 새로운 방법에 대한 전향적 검토가 필요할 것으로 생각된다.

배양법의 성적을 보면 본 연구의 경우 민감도와 특이도가 각각 56.4% 및 99.2%로써 전 등⁸)의 연구성적 (각각 52.9%와 100%)과 거의 비슷하였다. 그러나 염 등³)은 민감도와 특이도가 91.7%와 100%로 보고함으로써 저자들의 연구와는 민감도에 있어 매우 큰 차이를 보였고 효율성 역시 그들은 96.7%로 보고한데 비해 본 연구는 89.5%로 상이함을 보였다. 이와 같은 두 연구 결과간의 차이는 연구에 있어 채택한 결핵의 진단기준에 기인한 것으로 보인다. 염 등³)은 현재 항결핵제 투여 환자들 중 다른 검사에서 양성인 나오고 배양에서 음성이 나올 경우 이를 위양성으로 간주하여 비결핵 환자군으로 분류한데 비해 본 저자들은 이들을 결핵 환자군으로 분류하였다. 본 연구의 Table 4에 제시된 바에 따르면 항결핵제제를 투여하고 있는 환자들 26명 중 12명만이 배양에서 양

성이 나왔고 (약 46.2%) 항결핵제 비투여 결핵 환자 13명 중 10명이 배양에서 양성이 나오므로써 (약 76.9%), 결국 항결핵제가 환자들의 결핵균을 상당히 사멸시켜서 배양에서 음성이 나올 수 밖에 없었고 이들 음성 환자들이 배양성적의 전체 양성률을 낮추는 요인이 되었다. 그러므로, 만일 본 연구의 결핵 진단기준을 염 등의 기준에 따라 다시 보정할 경우 전체 결핵 환자 수는 25명이 되고 배양양성인 환자는 22명이 되므로 그 민감도는 88% 정도 될 것이다.

본 연구의 PCR 성적을 보면 민감도와 특이도가 각각 82.1% 및 96.2%로써 기존의 연구보고²⁸⁾와 거의 일치하였으나 역시 염 등³⁾ 결과와는 약간 달랐다 (민감도와 특이도는 각각 91.7%와 89.2%). 이처럼 각 검사실 마다 나타나는 민감도의 차이는 다음과 같은 4가지 요인에 의해 발생될 수 있다³⁾. 즉, ① 검사 방법의 분석적 민감도 ② 표준 검사인 배양법의 민감도 ③ 검사에 포함된 양성 검체의 분포도, 즉 약 양성에서 강 양성까지의 양성검체의 분포상황 ④ 약 양성 검체인 경우에 특히 문제가 되는 검체내 균분포의 불균질성 등이 있다.

이러한 요인들 외에도 DNA 추출 방법이나 PCR의 시행 방식에 따라 연구성적에 분명한 차이를 초래할 것이다. 결핵균은 일반 세균에 비해 DNA의 추출이 용이하지 않은데, 그 이유는 4층으로 구성된 결핵균의 세포벽에는 항산성을 결정짓는 긴 사슬의 지방산인 미콜산 (mycolic acid)이 60% 이상 함유되어 있기 때문이다. 따라서 수많은 잠균이나 숙주세포와 같은 PCR 방해물질이 존재하는 임상검체로부터 결핵균을 검출하기 위해서는 효과적인 DNA 분리가 PCR의 가장 중요한 요소라 할 수 있다. 본 연구에서 이용된 GuSCN/silica 법¹⁶⁾은 과거 단백질해효소 처리 및 phenol/chloroform 처리에 의한 방법보다 DNA를 효과적으로 추출할 수 있으며 결핵균 측정 감도 역시 과거의 방법보다 약 10배 정도 더 높은 결과를 얻을 수 있다고 한다¹²⁾. 또 검체 DNA의 첫 분리 단계에서부터 최종 DNA 회수 단계까지 한 용기에서 이루어지므로 문제점들을 해결할 수 있어 감도의 향상과 아울러 신뢰성 있는 자료를 얻을 수 있다고 생각된다¹⁶⁾. 뿐만 아니라, 과거 방법의 경우 검체내에 혼합된 생물학적 PCR 저해물질 (헤모글로빈이나 요산)과 유기용매 (페놀이나 클로로포름)가 DNA 추출과정에서 효과적으로 제거되지 못

해 위음성 반응을 일으키곤 했으나 본 연구에서 이용된 guanidium thiocyanate/silica법은 세균으로부터 분리된 DNA만 silica 입자에 흡착되고 다른 불순물들은 세척과정에서 완전히 제거되므로 그와 같은 문제점들을 극복할 수 있게 되었다¹²⁾. 본 연구에서 저자들이 이용한 PCR법은 nested PCR 방법으로써 이는 추출된 결핵균의 DNA를 1차적으로 증폭시켜서 검출하고 만일 여기에서 음성이 나올 경우 1차 PCR 산물을 다시 재증폭시켜서 검출하는 고민감도 방식이다.

이상의 연구 결과를 정리해보면 여러 결핵 진단법 중 PCR이 가장 높은 민감도 및 효율성과 최저의 위음성률을 보였다. 특히 결핵 환자 중 배양에서 음성을 보인 15 증례가 PCR에서 양성반응을 나타내었는데 이들 가운데에 이미 항결핵제제를 투여받은 환자가 다수 포함되어 있어 사균의 DNA가 PCR에서 검출된 것으로 판단된다. 그러나 특이도와 위양성률의 경우 배양법이 가장 우수하게 나타남으로써 '진단의 지연'이라는 단점에도 불구하고 이 방법의 임상적 가치를 시사하고 있으며 특히 항결핵제 투여로 인해 활성도가 소실되었거나 감소된 사균이 존재할 경우 혹은 과거 결핵 감염의 경력이 있는 사람들 중 항산성 염색법이나 PCR에서 양성인 경우에 있어 배양의 결과는 활동성 감염 여부를 판단하는데 중요한 근거가 되리라 생각된다. 또 한가지 흥미로운 사실은 항산성 염색법의 결과가 예상했던 것 보다 훨씬 높은 성적을 나타내었다는 점이다. 그럼에도 불구하고 본 연구의 전체적 결과들은 PCR법이 결핵 진단을 위한 매우 효율적이며 가치있는 우수한 임상 방법이라는 점들을 보여주고 있다.

향후 PCR법이 결핵 진단의 가장 신속하고 신뢰도 높은 일상검사로 자리잡기 위해서는 몇 가지 해결되어야 할 과제가 있다. 첫째, PCR법의 표준 지침이 수립되어야 한다. 현 등¹³⁾은 그 지침으로서 PCR법의 단순화, 신속화, 당일 결과보고, 경제성, 항산성 염색이 음성으로 나타나는 소량의 결핵균이 함유된 검체일지라도 양성반응을 나타내는 높은 예민도, 그리고 교차오염의 가능성 및 위음성 반응의 최소화 등을 제시하였다. 둘째, 위양성 반응의 최소화이다. 전 등⁸⁾은 위양성 반응의 예방을 위해 피펫의 분리 사용, 피펫 tip에 숨을 막아 pipetting에 의한 DNA의 혼입 방지, 중합효소 연쇄반응 혼합물의 clean bench 내에서의 준비, DNA thermocycler 사용 후 그 방의 자외선 조사,

그리고 다른 방에서의 전기영동실시 등을 제외하였으며, 최 등¹²⁾은 실험공간의 적절한 분리, 양성 과 음성 대조의 사용, DNA의 추출에서 PCR 산물의 폐기에 이르는 전과정의 철저한 정도관리 등을 제시하였다. 셋째, 인형 결핵균과 비인형 결핵균간의 감별 검출이 가능한 PCR법의 개발이다. 본 연구에서도 PCR 반응과 배양에서 양성을 보인 2예의 검체를 생화학적 테스트로 확인한 결과 비인형 결핵균으로 판명됨에 따라 이 문제는 좀더 심도있게 다루어져야 할 것으로 판단되었다. 넷째, 결핵 환자 중 항결핵제 투여에 따른 PCR 반응의 음성으로의 전환 시점에 대한 판단과 항결핵제 내성균주의 PCR적 특성의 규명을 위한 추가적 연구가 보다 더 필요하리라는 점이다.

결론적으로 PCR법은 결핵 진단을 위한 신속하고 효율적인 우수한 검사 방법이므로 일상적 임상 검사로의 활용가치가 매우 높다고 하겠다. 그러나 전통적인 여러 방법들 역시 임상상황에 따라 그 나름대로의 특별한 가치를 지니고 있는 까닭에 철저한 정도관리를 통해 PCR과 병행한다면 결핵균 검출율을 보다 높일 수 있으리라 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) 김성준, 김장성, 오달균, 문해란, 문홍모 (1993): 중합효소 연쇄반응을 이용한 비배양 객담에서의 *Mycobacterium tuberculosis*의 조기 검출. *대한미생물학회지*, **28**: 373-380.
- 2) 서순팔, 허윤, 기승정, 신종희, 양동욱 (1995): 임상검체에서 이중중합 효소 연쇄반응법에 의한 결핵균의 검출. *대한임상병리학회지*, **15**: 60-73.
- 3) 염양숙, 정옥연, 장숙진, 문대수, 박영진 (1995): 결핵균 검출을 위한 배양법, 항산성 염색법과 중합효소 연쇄반응법간의 비교. *대한임상병리학회지*, **15**: 594-603.
- 4) 오종석, 정선식, 류필열, 이현철, 정진, 양현승 (1992): Nested primer를 사용한 중합효소 연쇄반응에 의한 객담내의 결핵균 검출에 관하여. *전남대학교논문집 (의학편)*, **37**: 41-52.
- 5) 유철규, 심영수 (1991): 결핵의 진단. *대한의학협회지*, **34**: 484-489.
- 6) 윤경환, 이태윤, 조상애, 김득순, 정동현, 김주덕 (1991): 가검물내 결핵균 검출에 있어서 DNA 분리 방법에 따른 중합효소 연쇄반응의 민감도 비교. *대한미생물학회지*, **26**: 159-166.
- 7) 이태윤, 김성광 (1991): 중합효소 연쇄반응에 의한 DNA 진단. *영남의대학술지*, **8**: 13-23.
- 8) 전창호, 하경임, 김정숙, 김경동, 이영현, 양창현, 안우섭 (1993): 결핵 진단을 위한 중합효소 연쇄반응의 임상적 응용. *대한임상병리학회지*, **13**: 445-459.
- 9) 정소영, 김명유, 이정녀, 함건주 (1994): Cyto-centrifugation을 이용한 항산균의 검출에 관한 연구. *Korean J Clin Pathol*, **14**: 142-152.
- 10) 정운섭, 이경원, 이삼열 (1993): 10. *Mycobacterium tuberculosis*. pp. 115, 김노택, "최신 진단 미생물학", 제 2 개정판, 서흥출판사, 서울.
- 11) 조상래, 이태윤, 윤경환, 정동현, 정운섭, 김주덕 (1990): 중합효소 연쇄반응을 이용한 가검물내 *Mycobacterium tuberculosis*의 검출. *대한미생물학회지*, **25**: 491-499.
- 12) 최철석, 이경옥, 이규범 (1994): PCR을 이용한 결핵균 진단에 있어서 효과적인 DNA 추출법. *대한미생물학회지*, **29**: 155-160.
- 13) 현정애, 전효진, 김재룡, 전동석, 이원길, 은상진, 최성만 (1995): 모세관 중합효소 연쇄반응에 의한 결핵균 검출. *대한임상병리학회지*, **15**: 250-263.
- 14) 홍영표 (1991): 결핵의 역학-전국 실태조사 성적을 중심으로. *대한의학협회지*, **34**: 468-493.
- 15) Abe C, Hosojima S and Fukasawa Y (1992): Comparison of MB-check, BACTEC and egg-based media for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, **30**: 878-881.
- 16) Boom R, Sol CJA and Salimans MMM (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, **28**: 495-503.
- 17) Boyd JC and Marr JJ (1975): Decreasing reliability of acid-fast smear techniques for detection of tuberculosis. *Ann Intern Med*, **82**: 489-492.
- 18) Brisson-Noel A, Giquel B and Lecossier D (1989): Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*, **4(ii)**: 1069-1071.
- 19) Cornelia AS, Pfeiffer NC and Mclean T (1993): Evaluation of sputum smears concentrated by cyto-centrifugation for detection of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol*, **31**: 2371-2374.
- 20) Dariel TM and Debanne SM (1987): The sero-

- diagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzymed-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis*, **135**: 1137-1151.
- 21) Eisenach KD, Cave K and Bates JH (1990): Polymerase chain reaction of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, **161**: 977-981.
 - 22) Kwok S and Higuchi R (1989): Avoid false positives with PCR. *Nature*, **339**: 237-238.
 - 23) Larsson L and Odham G (1986): Diagnosis of mycobacterial infections using gas chromatography and gas chromatography/ mass spectrometry, p. 42-50. In M. Casal (ed.), *Mycobacteria of clinical interest*. Elsevier science Publishers BV, Amsterdam.
 - 24) Larsson L, Daham G, Westerdahl G and Olsson B (1987): Diagnosis of pulmonary tuberculosis by selected ion monitoring: improved analysis of tuberculostearate in sputum using negative ion mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, **25**: 893-996.
 - 25) Levy H, Feldman C and Sacho H (1989): A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest*, **95**: 1193-1197.
 - 26) Mullis KB and Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**: 335-350.
 - 27) Noordhoek GT, Van Embden JDA and KolK AHJ (1993): Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med*, **329**: 2036.
 - 28) Noordhoek GT, KolK AHJ and Bjune G (1994): Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol*, **32**: 277-284.
 - 29) Remick DG, Kunkel SL and Holbrook EA (1990): Theory and applications of the polymerase reaction. *Am J Clin Pathol*, **93**: S49-54.
 - 30) Roberts MC, McMillan C and Coyle MB (1987): Whole chromosomal DNA probes for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol*, **25**: 1239-1243.
 - 31) Saiki RK, Gelfand DH and Stoffel S (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
 - 32) Schlossberg D (1988): Tuberculosis. pp. 23-31, New youk, Springer-Velag Inc.
 - 33) Strumpt II, Tsang AY and Sayre JW (1979): Reevaluation of sputum staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, **119**: 599-602.
 - 34) Sudre P, ten Dam G and Kochi A (1992): Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull World Helth Drgan*, **70**: 149-159.

=Abstract=

**A Comparative Analysis on The Efficiency of Various Clinical Methods for
Diagnosis of Tuberculosis**

Seok-Cheol Choi[†], Chun-Hwan Jung*, Hee-Kyung Seong,
Tae-Un Kim and Won-Jae Lee*****

Department of Clinical Pathology, Jisan College, Pusan 609-757,

**Department of Clinical Pathology, Dong Eui Hospital, Pusan 614-052,*

***Department of Medical Laboratory Science, InJe University, Kim Hae 621-170,*

****Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea*

In recent years continuously increasing number of tuberculosis (TB) cases due to the emergence of strains with multidrug resistance and AIDS is a significant global health problem. Therefore, more rapid and reliable diagnosis of TB may be one of the most urgent needs in efforts to eradicate the disease. The present study was designed to compare and assess the diagnostic values and efficiencies between the conventional methods (X-ray, AFB stain and culture) and PCR for pulmonary TB on 171 cases. Chest X-ray finding and clinical features revealed that 39 (22.8%) of 171 sputum specimens were pulmonary TB cases. The statistical data were taken on the basis of the definitive diagnosis: In X-ray, overall sensitivity, specificity, efficiency and false positive and false negative incidence was respectively 69.2%, 87.1%, 83.0%, 12.9%, and 30.8%; 79.5%, 95.5%, 91.8%, 4.6% and 20.5% in AFB-stain; 56.4%, 99.2%, 89.5%, 0.8% and 43.6% in culture; 82.1%, 96.2%, 93.0%, 3.8% and 17.9% in PCR. PCR got a highest sensitivity and efficiency as well as a lowest false negative incidence. Culture had a highest specificity with a lowest false positive incidence.

These results imply that PCR assay is fast, sensitive and efficient method for diagnosis of pulmonary TB. However, combined use of the conventional methods with thorough quality control may offer more opportunities for detecting *Mycobacterium tuberculosis* and diagnosing TB although they have some limits.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, AFB-stain, Culture, PCR

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 5(2): 191-200, December, 1999]

[†] Corresponding author