

임상가검물과 파라핀 포매 조직에서 PCR법을 이용한 결핵균의 검출

충북대학교병원 해부병리과, 가톨릭대학교 대전성모병원 임상병리과*,
충북대학교병원 임상병리과**

김은중 · 최우순* · 황석연**†

국문초록: PCR을 이용한 임상가검물 중에서 보편화된 객담 이외에 미량의 각종 체액과 임상에서 많이 실시하지 않는 파라핀 포매 조직에서의 결핵균 검출을 실험하여 그 활용 가능성을 규명하고자 하였다. 임상가검물인 체액 65예는 항산성 염색과 배양검사, PCR을 실시하였고, 파라핀 포매 조직 50예는 항산성 염색과 병리조직학적 진단, PCR을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 본 실험 검체 중 임상가검물인 체액에서 항산성 염색 음성인 검체 중 12.1%, 배양검사에서 음성인 검체 중 3.7%에서 PCR 양성 결과를 보였고, 파라핀 포매 조직에서는 항산성 염색 음성인 검체 중 20.0%에서 PCR 양성 결과를 얻어 PCR이 민감도와 특이도가 높음을 확인할 수 있었다.

서 론

결핵을 진단하기 위한 보편적인 방법으로는 흉부 X-선 검사, 현미경적 검경 및 결핵균 배양검사가 이루어지고 있으나, 낮은 민감도와 검사시간의 지연 등의 단점으로 인하여 결핵 환자의 조기 발견과 그에 따른 적절한 치료에 어려움을 겪고 있음이 주지의 사실이다. 이를 보완하기 위하여 방사선 동위원소를 이용한 BACTEC system¹⁹⁾, 혈청학적 방법 또는 면역학적 방법^{14,31)}, restriction fragment length polymorphism (RFLP)^{6,18)}, DNA probe를 이용하는 방법 등이^{7,9)} 개발되어 왔으나 역시 민감도와 특이도 및 검사시간에는 문제가 제기되어 왔다. 1985년 이후 Saiki 등^{25,26)}에 의해 polymerase chain reaction (PCR) 방법이 개발된 이후 결핵균 DNA의 특정부분을 증폭하여 결핵균의 진단에 이용하게 되었다^{21,24)}.

그러나 PCR법을 수행하기 전 가장 중요한 것은 임상가검물에서 결핵균 DNA를 효과적으로 추출하는 것이다. 결핵균 검출을 위한 DNA 추출법

으로 proteinase K, guanidium thiocyanate (GUSCN), bead-beating 및 직접 가열법 등이 이용되고 있다²⁸⁾. 그러나 이들은 많은 조작을 필요로 하여 교차오염의 위험이 높거나, 지나치게 단순하여 검체 내의 PCR 저해제를 충분히 제거해 주지 못하며, 전체 시간이 많이 걸리는 등의 단점을 가지고 있다. 최근 국내에서 에탄올 (ethanol) 침전 없이 microwave로 처리하여 원침 후 상층액을 직접 PCR에 사용하여 시간과 교차오염을 줄이는 효과적인 방법이 개발되어, 그 중 Chelex-100 resin을 이용한 boiling법의 DNA 추출법이 개발되어 결핵진단을 위한 PCR법에 이용되고 있다¹⁾.

이에 본 연구는 DNA 분리에 따른 화학적인 방법에 비해 시간이 적게 들고 특이도와 민감도가 높게 보고된 바²²⁾ 있는 Chelex-100 resin을 이용한 boiling법을 DNA 추출에 이용하였다. 위와 같이 PCR은 결핵을 조기에 발견하기 위한 가장 좋은 검사방법이지만 측정 대상에 사용된 검체는 대부분 객담 혹은 일부 국한된 결핵 환자의 검체만을 대상으로 연구와 검사가 많이 이루어지고 있다^{10, 27)}. 그러나 본 연구는 임상 소견상 결핵이 의심되는 환자 중 어느 특정 검체만을 선정하지 않고, 검체가 미량으로 신속하고 정확한 검사가 요구되는 임상가검물인 체액을 대상으로 유의성을 알아

* 논문 접수: 2000년 2월 27일

수정재접수: 2000년 3월 15일

† 별책 요청 저자: 황석연

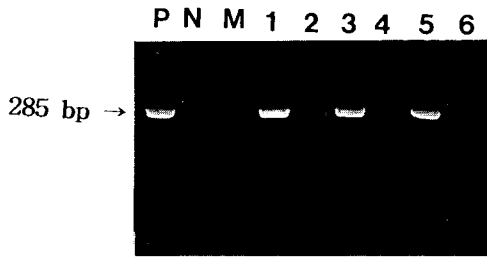


Fig. 1. Gel electrophoresis pattern of PCR products from acid fast sta negative specimens. P; positive control (KBN 5/6, KBN 7/8), N; negative control (3rd D,W.), M; marker of 100 bp DNA ladder, 1, 3, 5: positive patient specimens; 2, 4, 6: negative patient specimens.

보고자 하였으며, 특히 파라핀 포매한 조직 (paraffin embedded tissue, PET)에서 PCR을 이용한 연구와 검사는 아직 미비하고 임상에서 많이 실시하지 않고 있다. 또한 생검한 조직을 고정하는 과정에서 일반적으로 사용하는 포르말린은 PCR에 영향을 준다고 하였으며, 파라핀 포매한 조직을 자를 때 두께와 결핵균을 싸고 있는 상피세포도 영향이 있다고 하였다^{5,8,11,17}. 이에 본 실험에서 Chelex-100 resin을 이용하여 임상가검물과 파라핀 포매 조직에서의 PCR 검사법이 임상에서 유용한 검사로 활용할 수 있는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험균주

시험균주는 Bioneer (Bioneer Co. Ltd., Korea)사에서 구입한 positive control DNA를 사용하였고, 음성대조는 멸균된 3차 증류수를 사용하여 관찰하였다 (Fig. 1).

2. 임상검체

1997년 1월부터 1998년 7월까지 C병원에 결핵이 의심되어 의뢰된 검체 중에서 임상가검물인 체액 총 70예 중 urine 2예, β -globin 음성으로 확인된 3예를 제외한 65예를 대상으로 실시하였고, 파라핀 포매 조직은 총 52예 중 β -globin 음성으로 확인된 2예를 제외하고 50예를 실시하였다 (Table 1).

3. DNA의 추출

모든 임상가검물인 체액은 1.5 ml의 tube에 200

Table 1. Types and numbers of clinical and paraffin embedded tissue specimens

Specimens	Number	%
Urine	10	8.7
Neck aspiration	10	8.7
Pleural fluid	13	11.3
Cerebro spinal fluid	9	7.8
Ascitic fluid	10	8.7
Pleural*	13	13.9
Lymph node*	16	3.5
Neck*	4	3.5
Lung*	4	3.5
Larynx*	4	1.7
Nasal cavity*	2	1.7
Anus*	2	1.7
Skin*	2	1.7
Other	27	23.4
Total	115	100

*paraffin embedded tissue specimens

μ l을 담아 10분간 원침 후 상층액을 버리고 멸균된 3차 증류수 800 μ l를 넣어 15,000 rpm에서 10분간 원침을 실시하였다 (단, 점액성인 검체의 경우 4% NaOH를 넣어 액화시킨 후). 원침 후 다시 3차 증류수로 2회 세척하고, 상층액을 버린 후 5% chelex resin 150 μ l를 넣은 다음, heating block을 이용하여 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓이고 얼음에 10분간 방치시키는 과정을 2회 반복하고 15,000 rpm에서 10분간 원침을 실시하여 그 상층액 5 μ l를 PCR에 사용하였다. Oligonucleotide primer는 *Mycobacterium tuberculosis* DNA에 특이하게 반응하는 IS-6110 DNA 단편으로 KBN 5/6, KBN 7/8 (Bioneer Co. Ltd., Korea, Fig. 1)을 구입하여 사용하였고 primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 2).

Chelex-100 resin에 의한 DNA 추출을 확인하기 위하여 β -globin primer를 이용하여 DNA band를 확인한 후 PCR을 시행하였으며, β -globin primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 3).

파라핀 포매 조직의 PCR은 우선 파라핀 포매한 조직 두께를 4~6 μ m, 용적은 평균 0.1 mm³가 되도록 자른 후 첫 번째 자른 조직은 항산성 염색

Table 2. Oligonucleotide primers for *M. tuberculosis* PCR

Primer		Sequences
KBN 5/6 (1 st PCR)	sense	5'-CTCAAGGAGCACATCAGC-3'
	antisense	5'-TCATAGGAGCTTCCGACC-3'
KBN 7/8 (2 nd PCR)	sense	5'-CTACGGTGTTTACGGTGCCCC-3'
	antisense	5'-TCGGCGTCGGTGACAAAGGC-3'

Table 3. Oligonucleotide for β -globin primers

Primer		Sequences
GLO 1	sense	5'-CAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGG-3'
GLO 2	antisense	5'-ACAGTGCAGCTCACTCAGTGTGGC-3'

을 실시하고, 두 번째 중간 조직 5~10장을 PCR에 이용하였으며, 마지막 조직 절편은 첫 번째와 같이 항산성 염색을 실시하여 확인하였다.

파라핀 포매 조직에서의 DNA 추출은 5~10장의 절편을 1.5 ml의 멸균된 tube에 넣어 xylene 1 ml를 넣고 60°C에서 10분간 방치한 후 10분간 12,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액은 버리고 이 과정을 2회 반복한 다음 100% ethyl alcohol 1 ml를 넣고 혼합하여 12,000 rpm에서 원심분리를 실시한 후 공기 중에서 건조시킨 다음, boiling resin 150 μ l와 proteinase K 5 μ l를 건조된 추출물에 넣고 56°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 heating block에서 10분간 끓인 다음 얼음에 10분, 다시 10분간 끓인 다음 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 5 μ l를 PCR에 사용하였다. 5 μ l의 DNA 추출물은 1차 PCR에 KBN 5/6으로, nested PCR은 KBN 7/8 primer를 각각 1 μ l와 멸균된 3차 증류수 13 μ l를 premix top tube에 넣고 한 방울의 mineral oil을 넣은 후 PCR을 실시하였다.

4. PCR의 반응 조건

PCR의 반응 혼합액은 Bioneer (Bioneer Co. Ltd., Korea)사의 *M. tuberculosis* 검출 kit제품을 구입하여 사용하였으며, 그 조성은 thermostable DNA polymerase 1 U와 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 250 μ M, Tris-HCl (pH 9.0) 5 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM로 되어 있으며 모든 반응액 최종량은 20 μ l로 하였다. 1차 PCR은 premix-top tube에 13 μ l씩 D.W와 KBN 5/6 primer 각 1 μ l 및 시료

용액 5 μ l씩을 넣어, 이 premix-top tube를 내용물이 잘 섞이도록 혼합하고 microcentrifuge (Vision Scientific Co. Ltd., Korea)를 사용하여 13,000 rpm에서 5초간 원심분리를 실시하였다. 이후 증발을 막기 위해서 각 premix-top tube에 mineral oil 한 방울씩 넣고 thermal cycler (Hyaid Omnigene SM3, U.K)를 사용하여 반응시켰으며, 반응 조건은 95°C에서 5분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extention을 1주기로 31회 반복 수행 하였다. 2차 PCR은 1차 PCR산물 5 μ l를 사용하고 KBN 7/8 primer를 사용하여 같은 방법으로 실시하였다. PCR 반응이 끝난 산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 DNA band를 확인하였다.

결 과

1. 임상검체의 PCR 결과

임상가검물인 체액에서 실험한 결과, *M. tuberculosis*의 양성률은 총 65예 중 항산성 염색에서 10.8%, 배양검사 16.9%, PCR에서 20.0%의 양성률을 나타내 PCR이 항산성 염색이나 배양검사에 비하여 높은 양성률을 보였고, 배양검사 기준으로 항산성 염색과 PCR 모두 통계학적으로 유의성 ($p < 0.01$)을 나타냈다 (Table 4).

배양검사를 기준으로 항산성 염색과 PCR을 비교한 결과, 배양검사 양성인 검체 중 양성률은 항산성 염색 54.5%보다 PCR이 100%로 매우 높은 결과를 나타냈으며, 배양검사에서 음성인 검체

Table 4. The results of acid fast stain, culture and PCR in clinical specimens (n=65)

Method	No. of positive (%)
Acid-fast stain	7 (10.8)**
Culture	11 (16.9)
PCR	13 (20.0)**

** $p < 0.01$ by χ^2 -test

Table 6. The results of acid fast stain and PCR in paraffin embedded tissue specimens (n=50)

Method	No. of positive (%)
Acid-fast stain	8 (16.0)
Pathological diagnosis	31 (62.0)
PCR	17 (34.0)**

** $p < 0.01$ by χ^2 -test

Table 5. The results of acid fast stain and compared with there of bacteriological culture in clinical specimens

	Culture		Total	Kappa value
	+	-		
Acid-fast stain				0.616
+	6 (54.5)	1 (1.9)	7 (10.8)	
-	5 (45.5)	53 (98.1)	58 (89.2)	
PCR				0.898
+	11 (100)	2 (3.7)	13 (20.0)	
-	0	52 (96.3)	52 (80.0)	
Total	11 (100)	54 (100)	65 (100)	

중 양성률은 PCR에서 3.7%로 항산성 염색 1.9%보다 역시 높게 나타나 통계학적으로 유의한 차이가 ($p < 0.01$) 인정되었다 (Table 5).

이 외에 항산성 염색과 PCR을 비교한 결과 항산성 염색 양성인 검체 중 85.7%가 PCR 양성을 보였고, 항산성 염색 음성인 검체 중 12.1%가 PCR 양성을 나타냈다.

파라핀 포매 조직에서 *M. tuberculosis*로 진단한 검체는 62% 중에서 acid fast 염색 양성률은 16%, PCR 양성률은 34%로 나타났으며, 병리조직학적 진단을 기준으로 PCR은 통계학적으로 매우 유의한 결과 ($p < 0.01$)로 나타났다 (Table 6).

병리조직학적 진단을 기준으로 항산성 염색과 PCR을 비교한 결과 병리조직학적 진단에서 양성인 검체 중 PCR이 48.4%로 항산성 염색 22.6%보다 높은 양성률을 보였으며, 음성인 검체 중 PCR 양성률이 10.5%로 항산성 염색 5.3%보다 높게 나타났다 (Table 7).

이 외에 항산성 염색과 PCR을 비교한 결과 항산성 염색에서 양성인 검체 중 87.5%가 PCR 양성을 보였으며, 항산성 염색에서 음성인 검체 중 23.8%가 PCR 양성을 나타냈다. 검체별 양성률은

plural biopsy에서 가장 높았다. 통계학적 일치성 (kappa)은 임상가검물과 같이 병리조직학적 진단과 항산성 염색을 비교한 것 보다 병리조직학적 진단과 PCR을 비교한 것이 유의성 있게 나타났다 ($p < 0.01$).

2. PCR의 민감도와 특이도

Chelex-100 resin에 의한 DNA 추출을 이용한 PCR의 결과, 임상가검물인 체액에서는 배양검사 기준으로 한 결과 민감도는 PCR이 100%로 항산성 염색의 54.5%에 비하여 매우 높게 나타났고, 특이도는 PCR이 약간 높게 나타났다. 파라핀 포매 조직에서는 병리조직학적 진단을 기준으로 민감도는 PCR이 48.4%로 항산성 염색 22.6%보다 높게 나타났고, 특이도 역시 PCR이 94.7%로 항산성 염색 89.5%보다 높게 나타났다 (Table 8).

임상가검물과 파라핀 포매 조직에서 공통적으로 실험한 항산성 염색 기준으로 비교 한 결과, 민감도는 임상가검물인 체액에서 85.7% (6/7)와 파라핀 포매 조직에서 87.5% (7/8)로 비슷한 결과를 얻었고, 특이도는 임상가검물에서 76.2%와 파라핀 포매 조직에서 87.9%로 파라핀 포매 조직에

Table 7. The results of acid fast stain and PCR compared with the result of pathological diagnosis in paraffin embedded tissues

Histopathology	+	-	Total	Kappa value
Acid-fast stain				0.140
+	7 (22.6)	1 (5.3)	8 (16.0)	
-	24 (77.4)	18 (94.7)	42 (84.0)	
PCR				0.331
+	15 (48.4)	2 (10.5)	17 (34.0)	
-	16 (51.6)	17 (89.5)	33 (66.0)	
Total	31 (100)	19 (100)	50 (100)	

Table 8. Sensitivity and specificity of acid fast stain and PCR in clinical specimens and paraffin embedded tissues

	Sensitivity	Specificity
Clinical specimens		
Acid-fast stain	54.5% (6/11)	96.3% (52/54)
PCR	100% (11/11)	98.2% (53/54)
Tissues		
Acid-fast stain	22.6% (7/31)	89.5% (17/19)
PCR	48.4% (15/31)	194.7% (18/19)

서 높게 나타났다. 2차 PCR은 1차 PCR에서 보다 임상가검물은 1.6배, 조직에서는 2.1배의 높은 검출율을 보였다.

고 찰

PCR을 이용한 결핵균 진단은 그 진단에 있어서 신속하게 수행할 수 있고 뛰어난 감도와 특이성을 가진다는 점에서 매우 유용한 방법으로 확인되었다^{4,15}. 특히 *M. tuberculosis* 진단에 있어서 많은 연구와 보고가 이루어지고 있고 임상에서 진단에 이용하고 있으나 최근까지 보고된 자료들은 검체가 제한되어 있는 편이었다^{10,27}.

그러나 본 연구는 임상에서 결핵으로 의심되어 의뢰된 검체 중 특정 검체만을 선택하지 않고 일정한 기간동안 접수된 다양한 임상가검물을 실험하였고, 또한 임상가검물인 각종 채액에서 적담과는 달리 결핵균의 수가 매우 적었을 뿐만 아니

라 헤모글로빈, 요산 등 저해요인으로 인한 위음성률이 높아 이러한 요인을 효과적으로 제거하고 DNA를 추출하여 임상검사에 이용할 수 있는지 확인하였다.

특히, 파라핀 포매한 조직의 검체에 대한 보고와 검사는 보편화되어 있지 않아 본 실험에서 포르말린으로 고정하고 일련의 조직 처리과정을 거친 파라핀 포매한 조직에서의 DNA를 추출할 수 있는지 알아보았다. 우선 균 검출을 위한 DNA 추출법 중에서 Vince 등²⁹이 Chelex-100 resin을 이용한 boiling법에서 85%의 검출율을 보였고, 시간과 경비의 소모가 적으며 추출과정 또한 간단하고 특이도와 민감도가 뛰어나다고 보고하였다^{3,30}. 본 실험에서도 이와 같은 내용을 확인할 수 있었는데, 특히 검사 소요시간을 단축할 수 있었고, 항산성 염색법과 배양검사에서 음성인 검체 중 PCR 양성을 보여 세균수가 극히 미량인 검체에서도 결핵균 DNA를 검출할 수 있음을 보여주었다.

임상가검물인 채액에서 Noordhoek 등¹⁶은 배양검사와 PCR을 비교한 결과, 모두 양성은 4%이며, 배양검사에서 음성인 검체 중 PCR 양성으로 1.5%, 민감도와 특이도는 92.1%와 99.8%로 보고하였으며, 본 실험에서는 배양검사와 PCR 양성으로 16.9%, 그리고 음성인 검체 중 PCR 양성은 3.7%로 모두 Noordhoek 등¹⁶보다는 높은 결과를 나타냈다. 민감도와 특이도는 100%와 98.2%로 민감도는 높고 특이도는 비슷하게 나타났는데, 민감도가 높게 나타난 것은 검체 수가 적고, 예비실험을 통해 오염 범위를 줄였기 때문인 것으로 생각된다.

파라핀 포매한 조직에서 Popper 등²³은 항산성

염색에서 음성인 검체 중 PCR의 양성인 13.3%이고, Jordaen 등¹³⁾은 16.7%로 보고하였다. Perosio 등²⁰⁾은 항산성 염색에서 PCR의 민감도는 93%로 나타났고, Arnold 등²⁾은 민감도 83%와 특이도 98%로 보고하였다.

본 실험에서 항산성 염색과 PCR 모두 양성인 14%로 Noordhoek 등¹⁶⁾과 비슷한 결과를 나타냈다. 항산성 염색 음성인 검체 중 PCR 양성인 23.8%로 Popper 등²³⁾과 Jordaen 등¹³⁾보다 낮은 결과를 나타냈다. 민감도와 특이도는 87.5%와 76.2%로 민감도는 Perosio 등²⁰⁾보다 낮고 Arnold 등²⁾과는 비슷한 결과를 보였고 특이도는 본 실험이 높게 나타났다.

이와 같이 임상가검물인 체액뿐만 아니라 파라핀 포매 조직에서도 PCR의 특이도와 민감도가 비슷하거나 높게 나타나 임상에서 *M. tuberculosis* 진단에 이용할 수 있음을 확인하였다. 그러나 파라핀 포매 조직의 민감도를 더 높이기 위해서 저해요인에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 한편 헤모글로빈, 요산 등의 저해에 대한 연구로 Coates 등³⁾은 조직 두께의 중요성을 보고하였고, Dubeau 등⁸⁾은 *M. tuberculosis*의 세포벽과 주위를 싸고 있는 항원과 상피형 세포, 결핵의 결절에 있는 랑그한스거대세포 (Langhans giant cells), 그리고 폐포의 대식세포 (alveolar macrophages) 등이 영향을 준다고 하였다. Nuovo 등¹⁷⁾은 조직의 고정액으로 사용하는 포르말린의 영향으로 *M. tuberculosis*의 polynucleotide 구조를 변형시켜 DNA 추출에 영향을 준다고 보고하였다. Greer 등¹²⁾은 DNA를 추출하여 증폭시키는데는 10% buffered neutral formalin이 가장 좋은 고정액이며 고정시간과는 큰 영향을 미치지 않는다고 보고하기도 하였다.

본 실험에서도 조직의 두께에 대하여는 Coates 등³⁾의 내용과 일치하였고, 또한 세균수가 너무 많은 경우 template에 상응하는 primer의 증폭이 이루어졌으나 양이 많아 특정한 sequence가 혼란을 일으킨 것으로 생각되어 1차 PCR법에서 추출한 DNA를 다시 희석 배율을 높여 2차 PCR을 실시한 결과 양성으로 나타났다. 한편, 항산성 염색법에서 양성을 보인 검체에서 PCR 위음성을 보였는데 이는 파라핀 고정된 조직에서 파라핀이 제거되지 않았거나, DNA 추출과정에서 xylene이 완전히 제거되지 않은 것으로 여겨지며 저해시약에 대한 세심한 주의를 기울여야 할 것으로 생각된다. 결과적으로 위음성의 가장 큰 원인은 파라핀

포매한 조직을 자를 때의 두께와 저해시약의 영향으로 나타났으며, 10% neutral buffered formalin (NBF)에 대한 영향은 발견할 수 없었다.

임상가검물인 체액의 1예에서 PCR 위음성을 보였는데. 이는 균체의 용해나 추출 및 정제과정에서의 기술상 문제점으로 *M. tuberculosis*의 DNA가 추출되지 않았을 것으로 생각된다. 임상가검물인 체액의 항산성 염색에서 음성으로 나온 검체 중 7예와 배양검사서 음성으로 나온 검체 중 2예, 파라핀 포매 조직에서의 항산성 염색 음성인 검체 중 10예와 병리조직학적 진단에서 음성인 검체 중 2예에서 PCR 양성인 결과를 얻었는데 후향성 조사 결과 결핵을 치료한 경우가 있거나 현재 치료 중인 것으로 나타났다. 이와 같이 임상가검물과 파라핀 포매한 조직에서 PCR이 *M. tuberculosis* 진단에 특이도와 민감도가 높음을 확인하였고, 특히 파라핀 포매 조직에서의 결과는 저해요인을 효과적으로 제거하면 임상에 매우 유용한 검사로 이용할 수 있음을 확인하였다. 결론적으로 PCR법이 특이도와 민감도가 높으며 신속하고 정확한 검사로 임상가검물인 체액뿐만 아니라, 임상에서 보편화되어 있지 않은 파라핀 포매한 조직에서도 효과적으로 저해요인을 제거하고 *M. tuberculosis* 검출에 매우 유용한 방법으로 이용할 수 있음을 확인하였다. 아울러 위음성 원인에 대한 해결방안을 지속적으로 연구해야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 윤경한, 이태운, 조상래, 김득순, 정동현, 김주덕 (1991): 가검물내 결핵균 검출에 있어서 DNA 분리방법에 따른 중합효소 연쇄반응의 민감도 비교. 대한미생물학회지, **26**: 159-166.
- 2) Arnold M, Chan CY, Cheung SW, Vanhasselt CA and French GL (1988): Diagnosis of nasopharyngeal tuberculosis by detection of tubercylostearic acid in formalin fixed, paraffin wax embedded tissue biopsy specimens. *J Clin Pathol*, **41**: 1334-1336.
- 3) Brisson-Noel A, Aznar C and Chureau C (1991): Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet*, **338**: 364-366.
- 4) Buck GE, O'hara LC, Summer S and Gill JT

- (1992): Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **30**: 1331-1334.
- 5) Coates PJ, D'Ardenne AJ, Khan G, Kangro HO and Slavin G (1991): Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. *J Clin Pathol*, **44**: 115-118.
 - 6) Collins DM and Lisle GW (1984): DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *J Gen Microbiol*, **13**: 1019-1023.
 - 7) Drake TA, Hindler JA, Berlin OGW and Bruckner DA (1987): Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *J Clin Microbiol*, **25**: 1442-1445.
 - 8) Dubeau L, Chandler LA, Gralew JR, Nichols PW and Jones PA (1986): Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res*, **46**: 2964-2969.
 - 9) Eisenach KD, Crawford JT and Bates JH (1988): Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, **25**: 2240-2245.
 - 10) Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH and Crawford JT (1991): Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis*, **144**: 1160-1163.
 - 11) Fiallo P, Williams DL, Chan GP and Gillis TP (1992): Effects of fixation on polymerase chain detection of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*, **30**: 3095-3098.
 - 12) Greer CE, Peterson SL, Nancy HT, Kiviat B and Manos MM (1991): PCR Amplification from Paraffin-Embedded Tissues. *J Clin Pathol*, **95**: 117-124.
 - 13) Jordaan HF, Schneider JW, Schaaf HS, Victor TS, Geiger DH and Vanhelden PD (1996): Papilonecrotic tuberculid in children. *Am J Dermatopathol*, **18**: 172-185.
 - 14) Kadival GV, Mazarelo TBMS and Chaparas SD (1986): Sensitivity and specificity of enzyme linked immunosorbent assay in the detection of antigen in tuberculous meningitis cerebro spinal fluid. *J Clin Microbiol*, **23**: 901-904.
 - 15) Manjunath N, Shanker P, Rajan L, Bhargava A and Saluja, Shrinivas (1991): Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, **72**: 21-27.
 - 16) Noordhoek GT, Kaan JA, Mulder S, Wilke H and Kolk AH (1995): Routine application of the polymerase chain reaction for detection of *M. tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Pathol*, **48**: 810-814.
 - 17) Nuovo GJ and Richart RM (1989): Buffered formalin is the superior fixative for the detection of HPV DNA by in situ hybridization analysis. *Am J Pathol*, **134**: 837-842.
 - 18) Patel R, Kvach J and Mounts P (1986): Isolation and restriction endonuclease analysis of *Mycobacterial* DNA. *Gen Microbiol*, **132**: 541-551.
 - 19) Peterson EM, Floyd RC, Nakasone A, Fridly G and Maza LM (1989): Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary culture in BACTEC media using DNA probes. *J Clin Microbiol*, **27**(7): 1543-1547.
 - 20) Perosio PM and Frank TS (1993): Detection and species identification of mycobacteria in paraffin sections of lung biopsy specimens by the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*, **100**: 643-647.
 - 21) Pierre C, Lecossier D, Bousougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P and Hance AJ (1991): Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol*, **29**: 712-717.
 - 22) Pietrzak J, Frei R, Seen HP and Moroni C (1994): Comparison of PCR with stand method in the diagnosis of *M. tuberculosis* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **13**: 1079-1083.
 - 23) Popper HH, Winter E and Hofler G (1994): DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*, **101**: 738-741.

- 24) Saboor SA, Johson NM and McFadden J (1992): Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet* **339**: 1012-1015.
- 25) Saiki RT, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotech*, **24**: 476-480.
- 26) Saiki RT, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT and Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **4372**: 1350-1354.
- 27) Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Behari M and Shrinivas, Ahuja GK (1991): Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet*, **337**: 45-47.
- 28) Soni H, Skurnik M, Lippo K, Tala E and Noriega AR (1992): Detection of Mycobacteria amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J Clin Microbiol*, **30**: 2025-2028.
- 29) Vince A, Poljak M and Seme K (1998): DNA extraction from archival Gimsa-stained bone-marrow slides: Comparison of six methods. *Br J Haematol*, **101(2)**: 349-351.
- 30) Walsh PS, Metzger¹ DA and Higuchi H (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechnique*, **10(4)**: 506-513.
- 31) Yanez MA, Coppola MP, Russe DA, Delaha E, Chaparas SD and Yeager H (1986): Determination of mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, **23**: 822-825.

=Abstract=

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR from Trace Clinical Specimens and Paraffin-embedded Tissues

Eun-Joong Kim, Woo-Soon Choi* and Seock-Yeon Hwang†**

Department of Pathology, Chungbuk National University Hospital, Cheongju 361-711,

*Department of Clinical Pathology Taejon Catholic Hospital Taejon 301-012, Korea**

*Department of Clinical Pathology Chungbuk National University Hospital,
Cheongju 361-711, Korea***

This study has been carried out to investigate the sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) method over conventional acid-fast bacilli (AFB) staining and/culture methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* from trace body fluid and paraffin-embedded tissues (PET) specimens. A total of 65 cases were employed for the AFB staining and culture test, and a total of 50 cases were subjected to PCR and histopathological analysis.

Among the specimen showing negative reaction to AFB staining, 12.1% were positive to PCR and 3.7% of the specimen representing negative result to culture test showed positive reaction to PCR. In addition, 20.0% of the specimen with AFB negative showed positive reaction to PCR.

From these results, it could be concluded that PCR method overwhelms AFB staining and culture tests in sensitivity and specificity to *M. tuberculosis* detection.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Polymerase chain reaction (PCR), Clinical specimens, Paraffin-embedded tissues (PET)

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(1): 55-63, March, 2000]

† Corresponding author