

폐결핵 환자의 말초 혈액에서 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균 DNA의 검출

¹울산의대 서울아산병원 호흡기내과, ²진단검사의학과, ³연세대학교 원주의과대학 보건과학대학 임상병리학과
홍윤기¹, 조경욱¹, 이혜영³, 김미나², 성흥섭², 오연목¹, 이상도¹, 김우성¹, 김동순¹, 김원동¹, 심태선¹

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA by PCR in Peripheral Blood of Patients with Pulmonary Tuberculosis

Yoon Ki Hong, M.D.¹, Kyung Uk Jo, M.D.¹, Hyeoung Lee, Ph.D.³, Mi-Na Kim, M.D.², Heungsup Sung²,
Yeon-Mok Oh, M.D.¹, Sang Do Lee, M.D.¹, Woo Sung Kim, M.D.¹, Dong Soon Kim, M.D.¹, Won Dong Kim, M.D.¹,
Tae Sun Shim, M.D.¹

¹Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, ²Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea; ³Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju, Korea

Background: Although pulmonary tuberculosis (TB) is a respiratory disease, the presence of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DNA or Mtb itself has been reported in the peripheral blood (PB) of several patients with pulmonary TB. Additionally, it was recently announced that active pulmonary TB patients donated PB, and that this blood was then transfused to other individuals in Korea.

Methods: Sixty-nine patients with bacteriologically-confirmed pulmonary TB (35), non-tuberculous mycobacterial (NTM) lung disease (6), and other lung diseases (28) were enrolled in this study, which was conducted to determine if Mtb DNA could be detected in the PB by PCR. In addition, 10 pulmonary TB patients with high-burden bacilli were also enrolled in this study for the culture of Mtb in PB.

Results: PCR detected the presence of Mtb in 22.8% (8/35) of the pulmonary TB patients, in 16.7% (1/6) of the patients with NTM lung disease, and in none of the patients with other diseases (0%). In addition, no Mtb was cultured from the PB of the 10 pulmonary TB patients.

Conclusion: Although Mtb DNA was detected in the PB of some patients with pulmonary TB, viable Mtb was not isolated from the PB of those patients, which indicates that patients that viable Mtb may not be transmitted via trasfusion of blood of pulmonary TB patients. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 63: 331-336)

Key Words: Polymerase chain reaction, Peripheral blood, Pulmonary tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*.

서 론

결핵은 일반적으로 호흡기를 통한 전염성 질환이므로 폐결핵의 경우 객담을 포함한 호흡기 검체에서 결핵균을 검출하는 것이 확진법이다. 그러나 결핵의 병태생리상 초감염 결핵 후 결핵균이 혈액을 통하여 전신에 퍼지는 과정이 있으며 이 과정을 통하여 전신의 여러 장기에서 잠복결핵의 상태를 유지하게 된다. 속

립성(miliary) 결핵을 포함한 미만성(disseminated) 결핵은 전과기전이 혈액을 통하여 균이 전파되는 것으로 알려져 있다. 따라서 일반적이지는 않더라도 결핵 환자의 일부에서는 혈액에 결핵균이 존재하는 시기가 있을 가능성이 있다.

Fujiwara 등은 결핵 환자에서 말초혈액 세포가 면역학적으로 활성화된다고 보고하였고¹, 이에 근거하여 Schluger 등은 결핵 환자의 말초혈액에서 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DNA의 검출을 처음으로 보고하였다². 또한 Folveira 등은 후천성 인간면역결핍 바이러스(HIV)에 감염된 환자의 혈액배양에서 결핵균이 배양된 환자가 있음을 보고하였다³. 이처럼 결핵 환자의 혈액에서 결핵균이 배양되거나 결핵균 DNA가 검출된다는 점은 크게 두 가지 면에서 고려해 볼 가치가 있다. 첫째, 혈액 배양이나

Address for correspondence: **Tae Sun Shim, MD**,
Division of Pulmonary & Critical Care Medicine,
University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical
Center, 388-1 Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul, 138-736,
Korea
Phone: 82-2-3010-3892, Fax: 82-2-3010-6968
E-mail: shimts@amc.seoul.kr
Received: Sep. 13. 2007
Accepted: Oct. 9. 2007

혈액을 이용한 결핵균 PCR이 결핵의 진단에 유용성이 있는가 하는 점이다. 둘째는, 결핵 환자에서 채취한 혈액을 수혈 받으면 결핵이 전염될 수 있는가 하는 점이다.

말초혈액에서 결핵균 DNA를 검출하여 결핵 진단에 이용하고자 한 연구들이 몇몇 있었으나 연구마다 진단율의 차이가 있었으며⁴⁵, 그 유용성도 아직 확실하지 않다. 또한 헌혈로 인해 결핵균에 감염된 예는 없지만, 지연형 과민증(delayed hypersensitivity)을 유발하였다는 보고가 있었고⁶, 결핵에 감염된 후 발병까지는 오랜 시간이 걸리므로 헌혈과 결핵발병과의 인과관계를 명확히 밝히기는 실로 어려울 가능성이 많다.

이와 같이 말초혈액에서 결핵균 DNA가 검출된다는 사실은 결핵의 전염 가능성 및 그 진단에 있어서 도움을 줄 수 있을 것으로 예상되지만 이에 대한 임상적 의미와 유용성에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. 이에 저자들은 상기 문제들에 대한 향후 연구방향의 기초자료로 이용하고자 결핵 및 기타 폐질환을 가진 환자들의 말초혈액에서 결핵균 배양 및 PCR을 시행하여 보았다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

속립성결핵이 아닌 폐결핵, 비결핵항산균 폐질환, 폐암 및 폐렴 환자 69명을 대상으로 말초혈액에서 결핵균 PCR을 시행하였다. 난치성 다제내성결핵으로 지속적으로 균 양성인 경우(7명)를 제외하고는 나머지 폐결핵환자(28명)는 모두 치료 시작 전에 혈액을 채취하였다. 폐결핵은 모두 객담에서 항산균 배양 후 결핵균을 동정하여 진단되었다. 혈액 배양은 균의 양이 많을 것으로 추정되는 환자들, 즉 도말 양성이며 치료직전인 폐결핵 7명과 치료중이기는 하나 치료 실패로 지속적으로 균양성인 다제내성 폐결핵 3명을 합하여 총 10명을 대상으로 하였다.

2. PCR을 이용한 결핵균 검출(Figure 1)

결핵균 양성 판정은 16S-23S ribosomal DNA spacer 부위의 증폭을 통하여 확인하였다⁷. 혈액에서 분리한 DNA에서 결핵균의 16S-23S ribosomal DNA

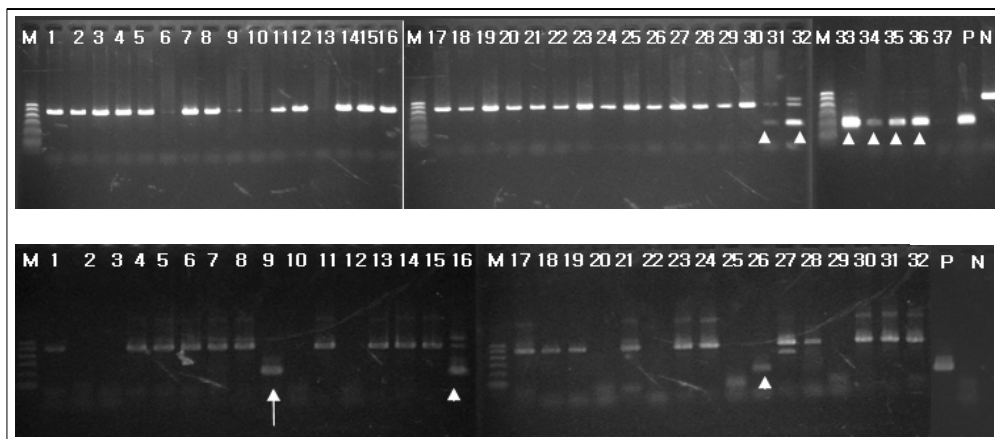


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of nested PCR products in 69 patients. Eight pulmonary TB (arrowhead) and one NTM patient (arrow) showed 190 bp-sized bands, suggesting *M. tuberculosis*. M: marker DNA, P: positive control, N: negative control.

Table 1. Baseline clinical characteristics of 69 patients

	No. of patients (%)
Pulmonary tuberculosis	35 (50.7)
NTM [†] pulmonary disease	6 [†] (8.7)
Lung cancer	20 (28.9)
Pneumonia	8 (11.6)

[†]Nontuberculous mycobacteria; [†] *Mycobacterium intracellulare*: 3 patients, *Mycobacterium abscessus*: 3 patients.

spacer부위의 증폭을 위하여 nested PCR을 수행하였다. 먼저 1차 PCR 증폭은 template DNA 5 ul와 Internal control DNA 2 ul, pre-mixture 13 ul (10 pmol primers, 2 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 10mM (pH 9.0) Tris-HCl, 200 uM dNTP, 2.5 U *Taq* DNA polymerase)를 넣고 최종 반응 부피를 20 ul로 하여 94°C에서 7분간 pre-denature시킨 후 총 35 cycle(94°C 30초, 68°C 30초, 그리고 72°C 30초)을 반응 시킨 후 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 2차 PCR의 template DNA로 사용하였다.

2차 PCR 증폭은 template DNA 2 ul와 pre-mixture 18 ul (10 pmol primers, 2 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 10 mM (pH 9.0) Tris-HCl, 200 uM dNTP, 2.5 U *Taq* DNA polymerase)을 넣고 최종 반응 부피를 20 ul로 하여 94°C에서 7분간 pre-denature시킨 후 총 35 cycle (94°C 30초, 72°C 30초)을 반응 시킨 후 72°C에서 7분간 더 반응 시킨 후 2% TBE agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide 염색 후 보여지는 PCR 산물의 크기로 결핵균의 양성 판정을 하였다.

3. 혈액 배양

혈액배양을 위한 피부소독은 채혈하려는 혈관 주위 피부를 70% 알코올을 적신 면봉으로 안에서 밖으로 원을 그리면서 닦고 그 안쪽을 10% 포비돈-요오드 면봉을 사용하여 같은 방법으로 한 번 더 닦은 후 마를 때까지 기다렸다. 주사기를 사용하여 5 mL의 혈액을 채혈한 후 70% 알코올로 입구를 소독한 BACTEC

Table 2. Positive PCR results for *M. tuberculosis* in each group

	Positive PCR (%)
Pulmonary tuberculosis	8/35 (22.8)
NTM [†] pulmonary disease	1/6 (16.7)
Lung cancer	0/20 (0)
Pneumonia	0/8 (0)

[†]Nontuberculous mycobacteria.

Myco/F Lytic 혈액배양병(Becton Dickinson, Sparks, Md)에 접종하였다. 접종한 혈액배양병은 BACTEC 9240 System (Becton Dickinson)에서 42일간 배양하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

결핵균 PCR은 총 69명에서 시행되었는데 남자 45명, 여자 24명이었고, 대상 환자들의 평균 나이는 52.3±16.6세이었다. 환자들의 기저 질환은 폐결핵 35명, 비결핵항산균 폐질환 6명, 폐암 20명, 폐렴 8명이었다(Table 1). 결핵 환자 35명에서 면역억제 환자는 간이식을 시행 받은 1명이 있었고, 항산균 도말 양성은 23명(65.7%)이었다. 혈액을 대상으로 결핵균 배양을 시행한 10명중 남자가 8명이었고, 평균 나이는 41.4±13.5세이었다. 이 중에서 7명은 PCR을 시행한 69명에도 중복으로 포함되었다. 10명은 모두 항산균 도말양성이었고, 이 중 3명은 다제내성결핵으로 치료중이었으나 치료실패로 모두 도말 및 배양 양성인 상태이었다.

2. 결핵균 PCR 검출

폐렴이나 폐암 환자 28명 모두에서 PCR은 음성이었고, 비결핵항산균 폐질환 6명 중 1명(*M. intracellulare*, 16.7%), 결핵 35명 중 8명(22.8%)에서 양성이었다(Table 2).

3. 혈액 배양

혈액 배양은 10명 모두에서 음성이었다.

고 찰

본 연구는 속립성이 아닌 폐결핵 환자의 혈액에서 도 결핵균 DNA가 검출됨을 확인할 수 있었다. 폐결핵 환자의 22.8%에서만 결핵균 DNA가 검출되어 민감도가 낮았지만, 폐암 및 폐렴 환자에서는 모두 결핵균 DNA가 검출되지 않았고 비결핵항산균 폐질환자 1명에서만 DNA가 검출되어 특이도(97.1%)는 아주 높았다. 그리고 혈액배양에서 균은 배양되지 않아 살아있는 균이 아닌 단지 DNA만이 혈액 내에 존재할 가능성을 시사하였다.

과거 연구 결과에 의하면 Ahmed 등은 면역적격자 폐결핵 환자 16명 중 7명(43.8%)에서 결핵균 PCR 양성임을 보고하였다⁸. Fogueira 등은 결핵환자 32명의 혈액에서 PCR을 시행하였는데 HIV 양성자 11명 중 9명(82%), HIV 음성자 21명 중 7명(33%) ($p < 0.05$)에서 PCR 양성임을 확인하였고, 혈액배양에서는 각각 1/8명 (12.5%), 1/18명(5.5%)에서 배양되었다³. 이 연구에서 미만성 결핵에서는 HIV 결과와 상관없이 모든 환자에서 PCR 이 양성이었다. 국내에서도 비슷한 연구로, Kim 등은 활동성 결핵 환자 45명 중 13명 (28.9%)에서 PCR 양성을 보였고 폐암 환자 13명 모두는 음성임을 확인하였다⁹. 본 연구에서는 폐결핵 환자 중 1명만이 면역억제환자이었고 이 환자에서 결핵균 PCR은 음성이었다.

이와 같이 혈액을 이용한 결핵균 PCR이나 혈액 배양에 대한 몇몇의 연구들이 있었지만 아직까지 진단적인 면에서의 유용성에 대해 결론을 내리기에 충분하지 않다. 대부분의 폐결핵은 객담 및 기관지세척액의 항산균 도말 및 배양 검사와 필요한 경우 PCR로 진단율을 높일 수 있으며 이러한 검사에서 음성일 경우에는 혈액 배양 검사 혹은 혈액 PCR도 음성일 가능성이 높을 것으로 추정된다. 그러나 균 검출이 어려운 폐외결핵의 경우에는 혈액배양 혹은 PCR이 도움이 될 가능성을 배제할 수 없다. Fogueira 연구에서는

HIV 양성이기는 하지만 폐외결핵 모든 환자에서 혈액 PCR이 양성이었다³. 객담에는 PCR을 억제하는 인자들이 많기 때문에 도말 음성인 경우 균배양 결과와 비교하였을 때 PCR 양성률은 약 50%에 지나지 않는다. 따라서 이런 경우에도 혈액 PCR의 진단적 유용성을 완전히 배제하기는 어렵다.

혈액에서 결핵균 DNA를 검출할 수 있는 이후로 제기되는 문제는 결핵 환자가 헌혈한 피를 수혈받으면 결핵이 전염될 수 있는가 하는 점이다. 헌혈할 때 결핵은 혈액매개성 질환이 아니므로 혈액, 객담 혹은 흉부사진 검사를 통하여 결핵 여부를 스크리닝 하고 있지 않다. 다만 결핵을 의심할 수 있는 증상, 즉 예로 들면 2주 이상의 지속된 기침, 여부를 설문지를 통하여 확인하고 있을 뿐이다. 2005년 대한적십자사 국정 감사에서 보고한 자료에 의하면 2003년 1월부터 2005년 6월까지 법정전염병 병력자 명단과 헌혈자를 대조한 결과 270명의 결핵환자가 헌혈을 하였음을 알 수 있었다. 이 환자들이 헌혈한 혈액의 일부를 헌혈 받은 230명을 조사한 결과 모든 환자에서 헌혈로 인하여 결핵이 발병한 예는 없었다. 문헌조사상 외국에서도 헌혈로 인하여 결핵이 발병한 예는 보고된 바 없다. 그러나 결핵에 감염된 후 발병까지는 오랜 시간이 걸리므로 헌혈과 결핵발병과의 인과관계로 명확히 밝히기는 실로 어려울 가능성이 많다. 과거 연구에 의하면 투베르쿨린 양성자의 전혈을 수혈함으로써 일시적으로 결핵감염 음성인 사람에서 투베르쿨린 검사 위양성을 보인 예는 보고된 바 있다⁶. 물론 현실적으로는 결핵치료중인 환자는 대부분 치료기간 동안 헌혈을 하지 않을 것으로 생각되지만 바이오테라가 증가하고 있는 시점에서 이에 대한 충분한 연구가 필요하리라 생각된다.

본 연구의 제한점으로는 첫째, 폐결핵 환자 중 1명을 제외하고는 모두 면역적격자여서 면역억제자에서의 결과는 확인할 수 없었다는 점이다. Fogueira 등의 연구에서 면역억제자의 말초 혈액에서 결핵균 PCR 검출률이 높은 것으로 보고된 바 있다. 둘째, 비결핵항산균 폐질환자 1명에서 결핵균 PCR 양성을 보였다는 점이다. NTM 혹은 *M. lepara*가 결핵균 PCR에서 위양성을 보인 경우가 보고된 바 있으나^{10,11} 본

연구에서도 NTM 자체가 PCR 위양성을 보인 것인지 혹은 결핵균의 오염에 의한 것인지 확인할 수 없었다. 마지막으로 혈액 배양의 숫자가 너무 적었다는 점을 들 수 있다. 하지만 모두 흉부사진, 항산균 도말 검사 결과 등의 소견을 바탕으로 결핵균이 많을 것으로 추정되는 환자들만을 대상으로 하였고, 국내에서 결핵 환자의 말초혈액에서 결핵균 PCR 뿐만이 아니라 혈액배양도 처음 시행하였다는 점에서 의미를 가질 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서는 미만성 결핵을 동반하지 않은 일부 폐결핵 환자의 말초혈액에서도 결핵균의 DNA가 검출됨을 확인할 수 있었으나 균배양이 되지 않는 것으로 보아 살아있는 균이 존재하기 보다는 균의 일부 성분만 존재할 가능성을 제시하였다.

요 약

연구배경: 결핵은 호흡기를 통한 전염성 질환이지만 말초혈액에서 결핵균 PCR이 양성이거나 결핵균이 배양된 보고가 일부 있었다. 이는 결핵의 진단에 있어서의 유용성과 헌혈을 통한 결핵의 전염 가능성의 두 가지 문제를 제기하게 되었고, 저자들은 상기 문제들에 대한 향후 연구방향의 기초자료로 사용하고자 연구를 시행하여 보았다.

방 법: 속립성 결핵이 아닌 폐결핵, 비결핵항산균 폐질환, 폐암 및 폐렴 환자 69명을 대상으로 말초혈액에서 결핵균 PCR을 시행하였고, 결핵균이 많을 것으로 추정되는 10명의 폐결핵 환자의 말초혈액을 대상으로 결핵균 배양을 시행하였다. 결핵균 PCR 은 nested PCR을 이용한 TB-taq (M & D, Korea)을 이용하였고 혈액배양에는 BACTEC Myco/F Lytic 혈액배양병(Becton Dickinson, Sparks, Md)을 사용하였다.

결 과: 결핵균 PCR을 시행한 환자는 69명으로 각각 폐결핵 35명, 비결핵항산균 폐질환 6명, 폐암 20명, 폐렴 8명이었다. 폐렴이나 폐암 환자 28명 모두에서

PCR은 음성이었고, 비결핵항산균 폐질환 6명 중 1명 (16.7%), 폐결핵 35명 중 8명(22.8%)에서 양성이었다. 혈액 배양은 폐결핵 10명 모두에서 음성이었다.

결 론: 미만성 결핵이 동반되지 않은 폐결핵 환자의 말초혈액에서 결핵균의 DNA가 검출됨을 확인할 수 있었으나 균배양이 되지 않는 것으로 보아 살아있는 균이 존재하기 보다는 균의 일부 성분만 존재할 가능성을 제시하였다.

참 고 문 헌

1. Fujiwara H, Kleinhenz ME, Wallis RS, Ellner JJ. Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:73-7.
2. Schluger NW, Condos R, Lewis S, Rom WN. Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1994;344:232-3.
3. Figueira L, Delgado R, Palenque E, Aguado JM, Noriega AR. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34:512-5.
4. Condos R, McClune A, Rom WN, Schluger NW. Peripheral blood based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1996; 347:1082-5.
5. Kolk AH, Kox LF, Kuijper S, Richter C. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in peripheral blood. *Lancet* 1944;344:694.
6. Schiller NB, Stein SC. Whole blood transfusion as a determinant of tuberculin sensitivity. *Am Rev Respir Dis* 1969;100:740-1.
7. Sansila A, Hongmanee P, Chuchottaworn C, Rienthong S, Rienthong D, Palittapongarnpim P. Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* by amplification of the 16S-23S ribosomal DNA spacer. *J Clin Microbiol* 1998;36:2399 - 403.
8. Ahmed N, Mohanty AK, Mukhopadhyay U, Batish VK, Grover S. PCR-based rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in blood from immunocompetent patients with pulmonary tuberculosis. *J Clin*

- Microbiol 1998;36:3094-5.
9. Kim GW, Lee JM, Kang MJ, Son JW, Lee SJ, Kim DG, et al. Clinical significance of PCR-based rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in peripheral blood. *Tuberc Respir Dis* 2001;50:599-606.
 10. Tjhie JH, van Belle AF, Dessens-Kroon M, van Soolingen D. Misidentification and diagnostic delay caused by a false-positive amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test in an immunocompetent patient with a *Mycobacterium celatum* infection. *J Clin Microbiol* 2001;39:2311-2.
 11. Chedore P, Broukhanski G, Shainhouse Z, Jamieson F. False-positive amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test results for samples containing *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 2006;44:612-3.
-