

신선조직 검체에서 결핵균 검출을 위한 자동화 중합효소연쇄반응 검사의 유용성

가톨릭대학교 대전성모병원 진단검사의학과¹, 병리과², 내과³

최우순¹, 신소영¹, 김종욱², 김명숙³, 이해경²

Usefulness of Automated PCR Test for the Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* in Fresh Biopsy Tissues

Woo Soon Choi, M.T.¹, So Young Shin, M.D.¹, Jong Ok Kim, M.D.², Myung Sook Kim, M.D.³, Hye Kyung Lee, M.D.²

¹Departments of Laboratory Medicine, ²Pathology and ³Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University, Daejeon, Korea

Background: Although there have been several studies regarding the clinical value of an automated TB-PCR study using sputum, bronchial washing, and other body fluid samples for the detection of pulmonary tuberculosis, there are only a few reports on the use of fresh tissue samples.

Materials and methods: The acid-fast bacilli stain (AFB), tuberculosis culture, automated TB-PCR study, and histopathology examination were performed in 42 fresh tissue samples.

Results: Among the 42 cases, 18 cases were diagnosed with tuberculosis based on the clinical findings. Sixteen of the 18 cases were TB-PCR positive and of these 16 cases, only 2 cases were positive in the AFB stain or culture study. However, all 18 cases showed the histopathology findings of chronic granulomatous inflammation that was compatible with tuberculosis. Based on the clinical findings, the sensitivity, specificity, positive predictability, and negative predictability of the automated TB-PCR study were 88.9%, 100%, 100%, and 92.3% respectively.

Conclusion: An automated TB-PCR assay is an important diagnostic tool for diagnosing tuberculosis in fresh tissue samples. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 61: 54-59)

Key words: Fresh tissue sample, Automated tuberculosis polymerase chain reaction (TB-PCR).

서 론

결핵은 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) 에 의해 발생하는 만성 감염성 질환으로 폐결핵이 가장 많으나 최근 human immunodeficiency virus (HIV) 감염의 확대, 면역억제제의 사용 등으로 폐 외 결핵도 증가하고 있다¹⁻². 세계보건기구에 의하면 결핵은 현재 감염성 질환 중 사망률 1위를 차지하는 질환으로 국내에서도 신규 결핵환자가 매년 3만 명 이상 발생되고 있다³⁻⁴.

결핵진단의 보편적인 방법은 흉부 X선 검사, 항산

균 도말검사 그리고 배양검사 등이 있으나 *M. tuberculosis*의 염기배열이 밝혀지고 일부분의 deoxyribonucleic acid (DNA)만을 선택적으로 대량 증폭시킬 수 있는 중합효소연쇄반응검사 (polymerase chain reaction test for *M. tuberculosis*, TB-PCR) 방법이 개발되면서 높은 민감도 및 특이도와 함께 검사시간을 단축시킬 수 있는 검사방법으로 TB-PCR을 많이 이용하고 있다⁵⁻¹⁰.

최근 자동분석기를 이용한 TB-PCR 검사가 도입되면서 결과의 객관성과 정확성을 높이게 되었으며 객담, 기관지 세척액 같은 다양한 검체에서 자동분석기를 이용한 TB-PCR 검사의 유용성에 대한 연구가 있었다⁷⁻¹³. 그러나 조직 검체에서 연구는 그리 많지 않으며 그 결과도 저자마다 차이를 보이고 있다¹⁴⁻²². 이에 저자들은 신선 생검 조직에서 자동화 기기인 COBAS AMPLICOR MTB PCR assay (Roche Molecular Systems)를 이용한 TB-PCR 검사의 유용성을 알아보려고 하였다.

Address for correspondence : Hye Kyung Lee, M.D.

Department of Pathology, University of Catholic University College of Medicine, Daejeon St. Mary's Hospital, 520-2 Daehung-dong, Jung-Gu, Daejeon 301-723, Korea

Phone : 042-220-9612 Fax : 042-220-9915

E-mail : apw01@hanmail.net

Received : May. 11. 2006

Accepted : Jul. 4. 2006

대상 및 방법

1. 대상

2004년 10월부터 2005년 12월까지 가톨릭대학교 대전성모병원 병리과와 진단검사의학과에 결핵의진화에 조직검사와 신선조직을 이용한 항산균 도말검사, 배양검사, TB-PCR 검사가 공히 의뢰된 환자 42예를 대상으로 하였으며 본 연구에 대한 임상시험위원회의 승인과 동의를 얻었다.

2. 방법

가. 항산균 도말검사, 배양검사

검체는 직접 슬라이드에 도말하여 Ziel-Neelsen 염색을 실시하였다. 배양용은 항산균 도말검사 후 나머지 검체를 3% Ogawa 배지에 접종하여 37°C에서 최대 8주간 관찰하였다.

나. 결핵균 TB-PCR검사

1) 생검 조직 검체 처리

생검 조직은 멸균된 튜브에 받았고 크기는 5×5×5 mm 정도 이내로 하였으며 생검 후 검사 시까지 4°C 냉장 보관하여 3일을 넘지 않도록 하였다. TB-PCR검사의 전 처리를 위해 1.5ml 튜브에 검체와 4% NaOH 1ml를 넣어 진탕 후 30분간 방치 후 멸균된 일회용 주사바늘을 이용하여 육안으로 완전히 균질화 될 때까지 진탕과 방치를 30분간 실시하였다. 균질화가 잘 되지 않거나 점액성분이 남아 있는 경우 15ml 튜브에 옮겨 4% NaOH를 3-5ml 첨가 하여 다시 진탕과 방치를 반복 하였다. 육안으로 조직의 형태가 더 이상 보이지 않으면 증류수를 동량 넣어 진탕하고 3000 RPM에서 15분간 원심 후 침사를 TB-PCR에 이용하였다.

2) TB-PCR 검사

제조회사의 방법에 의해 washing buffer 500μl를

1.5ml 튜브에 미리 분주하고 침사 100μl를 옮겼다. 진탕한 후 13000 RPM에서 10분간 원심 후 상층액을 제거하고 침사에 lysis 용액 100μl를 을 넣고, 진탕 후 heating block에서 60°C, 45분간 반응하였다. neutralization 용액 100μl 넣고 진탕 후 3000 RPM에서 5초간 원심 후 상층액 50μl 와 master mix 50μl를 반응튜브에 넣고 AMPLICOR (Roche Molecular System, Inc., Branchburg, NJ, USA) 기기에서 검사하여, OD 값 0.35 이상을 양성으로 하였다.

다. 조직학적 소견

생검 조직은 10% 중성포르말린에 고정 후 파라핀에 포매한 후 연속 절편하여 H&E 염색 및 Ziehl-Neelsen염색을 하였다. 조직학적 소견에서 육아종, 다핵 거대세포, 괴사병변의 유무를 관찰하였다. 두 장의 Ziehl-Neelsen염색 슬라이드를 만들어 두 명의 병리학자가 각 각 400배에서 관찰하였다.

라. 임상 진단

임상적 결핵진단은 세균학적 또는 조직학적 소견과 방사선학적으로 결핵에 합당한 증상이나 소견으로 진단을 받고 결핵제 치료를 받은 경우로 정의 하였다.

마. 결과 분석

TB-PCR 검사의 유용성 평가를 위해 배양검사와 항산균 도말검사와 비교 분석 하였으며, 임상 진단 기준으로 민감도, 특이도, 양성 예측도 및 음성 예측도를 계산하였다.

결 과

1. 신선조직 검체의 종류

신선조직으로 의뢰한 검체 42예 중 림프절이 38예(90.4%)로 가장 많았고, 폐 조직 2예, 충수 조직 2예였다. 총 42예 중 TB-PCR 양성은 16예(38.1%)였으며 그 중 13예(81.3%)가 림프절 이었다. (Table 1).

Table 1. Type and number of fresh tissues according to TB-PCR positivity

Specimens	TB-PCR(+)	TB-PCR(-)	Total
Lymph node	13(81.3%)	25(96.2%)	38(90.4%)
Lung	2(12.5%)	0	2(4.8%)
Appendix	1(6.3%)	1(3.8%)	2(4.8%)
Total	16(100%)	26(100%)	42(100%)

Table 2. The results of the TB-PCR test in fresh tissues

	TB-PCR(+)	TB-PCR(-)	Total
AFB(+) Culture(+)	1(6.3%)	0	1(2.4%)
AFB(+) Culture(-)	0	0	0
AFB(-) Culture(+)	1(6.3%)	0	1(2.4%)
AFB(-) Culture(-)	14(87.5%)	26(100%)	40(95.2%)
Total	16(100%)	26(100%)	42(100%)

2. 임상소견과 TB-PCR 결과 비교

총 42예 중 임상소견에 의해 결핵환자로 진단 및 치료를 받은 환자는 18예였으며 비결핵환자는 24예였다. 결핵환자 18예 중에서 항산균 도말검사 양성인 1예(5.6%), 배양검사 양성인 2예(11.1%), TB-PCR 양성인 16예(88.9%)였다. 비결핵환자 24예는 모두 TB-PCR 음성이었다. TB-PCR 검사와 항산균 도말검사, 배양검사와의 상관관계를 알아볼 때, 항산균 도말검사와 배양검사 하나라도 양성이면서 TB-PCR 양성인 경우가 2예(12.5%), 항산균 도말검사와 배양검사 모두 음성이면서 TB-PCR 양성인 경우가 14예(87.5%)였다. TB-PCR 음성인 26예는 항산균 도말검사와 배양검사 모두 음성이었다(Table 2). 임상소견을 기준으로 TB-PCR의 민감도, 특이도, 양성 예측도와 음성 예측도는 각각 88.9% (16/18), 100%(16/16), 100%(16/16)와 92.3%(24/26)이었다(Table 3).

Table 3. The results of TB-PCR test according to final diagnosis

Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
88.9%(16/18)	100%(24/24)	100%(16/16)	92.3%(24/26)

Table 4. The results of the AFB smear, culture, TB-PCR test histopathology in fresh tissues

	Tuberculosis(n=18)	No tuberculosis (n=26)
Fresh tissue AFB (+)	1(5.6%)	0
Culture (+)	2(11.1%)	0
TB-PCR (+)	16(88.9%)	0
Granuloma (+)	18(100%)	0

3. 조직학적 소견과 TB-PCR 비교

임상소견에 의해 결핵환자로 진단 및 치료를 받은 환자 18예 모두에서 육아종성 병변이 관찰되었으며 이 중 16예는 TB-PCR 양성이었다. TB-PCR 음성인 2예는 육아종성 병변을 보인 2예 중 1예는 흉부 방사선 소견 상 폐결핵을 시사하였다. TB-PCR 음성인 환자 24예에서는 괴사나 육아종성 병변이 관찰되지 않았다(Table 4).

고 찰

중합효소반응을 이용한 분자 생물학적 연구가 발전하면서 결핵의 진단 분야에서도 그의 정확성과 신속성에 큰 변화가 있었다. 폐결핵의 진단을 위해 객담과 기관지 세척액 검체에서 TB-PCR 검사를 시작한 후 폐 외 결핵의 진단을 위해 흉수액이나 소변과 같은 체액 검체, 신선조직 검체, 세침흡인 검체 등에서도 TB-PCR 검사가 활발하게 진행 중이다⁷⁻¹⁸. 결핵의 대부분을 차지하는 폐결핵인 경우 흉부 방사선 소견, 객담 검사, 기관지 세척액 검사 등 다양한 검체와

다양한 검사가 진단을 위해 이용 가능한데 비해 폐 이외의 결핵인 경우 병변을 보이는 일부 장기나 조직에 병변이 국한되어 있으므로 가능하면 한정된 검체에서 할 수 있는 모든 검사를 시행하여 진단에 필요한 정보를 얻는 것이 중요하다.

폐 외 결핵의 진단은 주로 생검을 통한 조직 검사에 의해 이루어지는데 H&E 염색 상 건락성 괴사를 동반한 만성 육아종성 병변이 중요한 소견이다. 현재까지 국내에서 건락성 괴사를 동반한 만성 육아종성 염증 시 결핵의 가능성이 가장 크다고 알려져 있지만 만성 육아종성 병변이 지속적인 항원 자극에 대한 면역학적 반응이란 점을 고려할 때 진균성 감염, 이물질에 대한 반응, 매독 등과 같은 여러 다른 요인들의 가능성도 배제할 수 없으며 매우 작은 조직 검체를 진단 시 아급성 림프절염이나 허혈성 괴사를 동반한 림프절의 변화와의 감별이 쉽지 않을 수 있다. 또한 현미경적 소견 상 육아종성 염증 소견과 균 자체의 확인을 위한 항산균 도말검사, 결핵균 배양 검사와의 상관관계는 그리 높지 않아 조직검체의 결핵진단을 보완해 줄 수 있는 또 다른 검사방법으로 민감도가 높은 TB-PCR에 대한 관심이 높았다.

조직검체를 이용한 TB-PCR 검사방법은 크게 파라핀 포매 조직을 사용한 in-house PCR법, 파라핀 포매 조직을 사용하고 PCR-자동분석기를 이용한 방법, 신선 조직 검체를 사용한 in-house PCR법, 신선 조직 검체를 사용한 PCR-자동 분석법이 있다. 국내에서 조직을 이용한 TB-PCR 검사 방법은 파라핀 포매 조직을 이용한 in-house PCR법 이 기술되어 있으나^{21,22} 신선 검체를 이용한 TB-PCR 자동분석기에 의한 결과는 아직 보고된 바가 없다.

조직 검체를 이용한 TB-PCR 시행 시 파라핀 포매 조직을 신선 생검 조직과 비교할 때, PCR 전처리 과정이 길고, 검체가 4-5 μ m 절편이므로 조직량이 적으며, 파라핀 포매까지의 과정에서 여러 화학물질에 노출되어 조직 내의 DNA의 손상이 많다. 그리고 in-house PCR법은 각 병원마다 검사자의 숙련도, 사용되는 primer의 농도, 각 검사기관별 다른 검사방법에 따라 진단의 민감도에서 차이가 있다²³⁻²⁵. 이에 저

자들은 진단 검사의학과에서 B형 간염, C형 간염, 객담과 기관지 세척액의 결핵 진단을 위해 사용되어왔던 TB-PCR 자동화 검사 장비를 이용하여 신선 조직 검체의 TB-PCR 검사를 시행하여 전 처리 이후의 과정을 동일한 조건으로 하여 정도관리면에서 객관화시키고 신선 조직을 이용하여 결과의 민감도를 높이고자 하였다.

본 연구에서 신선 조직을 이용한 TB-PCR 자동 분석기에 의한 민감도는 임상소견을 기준으로 하였을 때 88.9%로 타 저자들^{14,16}이 9.1-12%로 보고 한 것에 비해 매우 높은 민감도를 보였는데 이는 조직을 충분히 분해하는 전처리 과정 때문으로 생각하였다.

저자들은 전 처리 과정 시 조직을 충분히 균질화시키기 위해 1.5ml 튜브에 검체와 4% NaOH 1ml를 넣어 진탕 후 30분간 방치 후 멸균된 일회용 주사바늘을 이용하여 육안으로 완전히 균질화 될 때까지 진탕과 방치를 30분간 실시하였다. 균질화가 잘 되지 않거나 점액성분이 있는 남아 있는 경우, 15ml 튜브에 옮겨 4% NaOH를 3-5ml 첨가 하여 다시 진탕과 방치를 반복 하였다.

본 연구에서 현미경적 조직소견과 결핵진단을 위한 항산균 도말검사, 결핵균 배양 검사, TB-PCR 검사와의 상관관계를 살펴보면 조직학적 소견 상 건락성 괴사나 육아종성 반응 존재시 TB-PCR 양성율은 88.9%로, 타 저자들^{17,18}이 기술한 in-house법의 43.8-77.8%의 양성율에 비해 높았다. 또한 파라핀 포매 조직검체에서 건락성 괴사나 육아종성 병변을 보이지만 통상의 검사인 항산균 도말검사와 배양검사가 음성인면서 TB-PCR 결과만이 양성인 예가 87.5%인 점은 조직의 결핵진단 시 TB-PCR 검사의 결과를 반드시 참조해야한다는 점을 강조하는 결과였다. 이에 저자들은 임상적으로 결핵이 의심되는 조직 검체 생검 시 포르말린 고정 전 신선 검체의 TB-PCR의 검사가 중요할 것으로 생각되었으며 자동화 TB-PCR 검사가 기존의 in-house법에 의한 TB-PCR 검사보다 정도관리 면과 진단의 민감도 면에서 낫다고 생각되었다.

요 약

연구 배경 : 결핵의 대부분을 차지하는 폐결핵 진단에 객담, 기관지 세척액, 흉수액을 이용한 TB-PCR 검사의 유용성에 대해서는 여러 연구가 있었으나 폐 이외의 결핵 진단을 위한 신선 생검 조직 검체에서의 TB-PCR법 연구는 아직 미흡하다. 이에 저자들은 자동분석법인 COBAS AMPLICOR MTB PCR assay (Roche Molecular System)를 이용하여 신선 생검 조직 검체로 TB-PCR법의 유용성을 알아보았다.

방법 및 대상 : 2004년 10월부터 2005년 12월까지 가톨릭대학교 대전성모병원 병리과와 진단검사의학과에 결핵의진 하에 조직검사와 신선조직을 이용한 항산균 도말검사, 배양검사, TB-PCR 검사가 공히 의뢰된 환자 42예를 대상으로 하였다.

결 과 : 신선 생검 조직 42예를 대상으로 실시한 결과, 임상소견에서 결핵으로 진단된 경우는 18예이었으며, 그 중 림프절 12예와 폐 조직 2예, 흉수 조직 1예, 총 16예(88.9%)에서 PCR 양성을 보였고, 민감도와 특이도, 양성예측도, 음성 예측도는 88.9%, 100%, 100%와 92.3%로 나타났다. 조직학적으로 육아종 소견과 건락성 괴사의 소견 보인 18예(100%)는 모두 결핵으로 진단되었고 그 중 16예(88.9%)에서 PCR 양성을 보였다.

결 론 : 신선 생검 조직 검체를 이용한 TB-PCR 자동분석기의 결과는 임상소견 및 현미경적 소견과 비교 분석 시 민감도와 특이도가 높은 유용한 검사라고 생각되었다.

참 고 문 헌

- Field S, Lewis S. Intestinal and peritoneal tuberculosis In: Rom WN, Garay WN, editors. Tuberculosis. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 523-47.
- Singh V, Kumar P, Karmal J, Prakash V, Vaiphei K, Singh K. Clinicocolonoscopy profile of colonic tuberculosis. Am J Gastroenterol 1996;91:565-8.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing: WHO report. 2004.
- Korea Center for Disease Control & Prevention. 2004 Communicable Diseases Statistical Yearbook. 2004.
- Kim CS, Son HD, Park MR, Seo JY, Cho DI, Rheu NS. The usefulness of PCR in AFB smear negative patients on admission. Tuberc Respir Dis 1997;44: 1001-10.
- Mo EK, Kyung TY, Kim DG, Park MJ, Lee MG, Hyun IG, et al. The clinical utility of polymerase chain Reaction in the bronchoalveolar lavage fluid for the detection of Mycobacteria. Tuberc Respir Dis 1998;45:519-28.
- Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol 2003;41:5355-65.
- Park MH, Choi CH, Kim NJ. The diagnostic value of bronchoalveolar lavage fluid microscopic study and PCR in pulmonary tuberculosis. Tuberc Respir Dis 1996;43:128-37.
- Lee JS, Ji HS, Hong SB, Oh YM, Lim CM, Lee SD, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction for the differentiation of nontuberculous mycobacteria in patients with acid-fast bacilli smear-positive specimens. Tuberc Respir Dis 2005;58:452-8.
- Yu CM, Koh WJ, Ryu YJ, Jeon KM, Choi JC, Kang EH, et al. Usefulness of PCR test for *M. tuberculosis* for the differentiation of pulmonary tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease in patients with smear-positive sputum. Tuberc Respir Dis 2004;57:528-34.
- Lee JG, Kim YS, Park JM, Ko WK, Yang DG, Kim SK, et al. Clinical utility of bronchial washing PCR for IS6110 and amplicor for the rapid diagnosis of active pulmonary tuberculosis in smear negative patients. Tuberc Respir Dis 2001;50:213-21.
- Rajahti I, Vuorinen P, Nieminen M, Miettinen A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by the automated Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis test. J Clin Microbiol 1998;36:975-8.
- Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and non respiratory specimens. J Clin Microbiol 1998;36:2853-60.
- Park DK, Park JH, Kim YS, Oh YL, Park CH, Jeon YT, et al. Clinical significance of total colonoscopy in patients with active pulmonary tuberculosis without gastrointestinal symptoms. Korean J Gastroenterol 2002;24:193-9.
- Driscoll JR, Parsons LM, Salfinger M, Taber HW. Genomic analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: applications to laboratory diagnosis and genotyping. Rev Med Microbiol 2005;16:49-58.

16. Rimek D, Tyagi S, Kappe R. Performance of an IS6110-based PCR assay and the COBAS AMPLICOR MTB PCR system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in human lymph node samples. *J Clin Microbiol* 2002;40:3089-92.
 17. Fidler HM, Rook GA, Johnson NM, McFadden J. *Mycobacterium tuberculosis* DNA in tissue affected by sarcoidosis. *BMJ* 1993;306:546-9.
 18. Singh KK, Muralidhar M, Kumar A, Chattopadhyaya TK, Kapila K, Singh MK, et al. Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in granulomatous lymphadenopathy. *J Clin Pathol* 2000;53:355-61.
 19. Ko KY, Lim MC, Huh CY. A case of retroperitoneal tuberculous lymphadenopathy. *Korean J Obstet Gynecol* 2004;47:759-62.
 20. Kim SE, Kim CH, Park YB, Lee JY, Cho SJ, Shin HS, et al. Superior vena caval syndrome due to tuberculous lymphadenitis. *Tuberc Respir Dis* 2004; 57:368-71.
 21. Kim KM, Lee AH, Choi KY, Oh SJ, Shim SI. Pathologic diagnosis of intestinal tuberculosis in endoscopic biopsied material. *Korean J Pathol* 1997; 31:754-64.
 22. Lee YJ, Yang SK, Myung SJ, Byeon JS, Park IG, Kim JS, et al. The usefulness of colonoscopic biopsy in the diagnosis of intestinal tuberculosis and pattern of concomitant extra-intestinal tuberculosis. *Korean J Gastroenterol* 2004;44:153-9.
 23. Peter JB. The polymerase chain reaction: amplifying our options. *Rev Infect Dis* 1991;13:166-71.
 24. Persing DH. Polymerase chain reactions: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;29:1281-5.
 25. Shin WS. Diagnosis of tuberculosis: serodiagnosis and molecular biologic approach. *Tuberc Respir Dis* 1992;39:1-6.
-