

## 객담에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 결핵균 검출법의 평가

최윤미, 이명희

한국보훈병원 임상병리과

### Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by using Polymerase Chain Reaction

Youn Mi Choi, M.D. and Myung Hee Lee, M.D.

Department of Clinical Pathology, Korea Veterans Hospital, Seoul, Korea

**Background** : The recently developed nucleic acid amplification methods may provide us with very sensitive, specific and rapid tests for the detection of *M. tuberculosis*. So the aim of this study was to compare the commercial Amplicor *M. tuberculosis* kit and our in-house polymerase chain reaction (PCR) with the conventional culture and direct AFB staining method.

**Materials and Methods** : Among the total of 2,340 clinical specimens, 1,314 sputum samples were tested for the presence of *M. tuberculosis* by Amplicor PCR and 1,026 sputum samples were tested by in-house PCR performing with resin matrix preparation and DNA extraction, synthesized primer pair, detection using agarose gel electrophoresis.

**Results** : One hundred-seventeen specimens were positive by Amplicor PCR, 105 were positive by in-house PCR, 185 were positive by culture. The sensitivity of the Amplicor PCR for all of the specimens and for smear-positive and smear-negative specimens was 92.9%, 97.9% and 88.2%, respectively after discrepant analysis. The sensitivity of the in-house PCR for all of the specimens and for smear-positive and smear-negative specimens was 80.0%, 93.6% and 65.5%, respectively after discrepant analysis. The specificity of the Amplicor PCR and in-house PCR for all of the specimens was 97.9% and 99.0%, respectively.

**Conclusions** : Amplicor PCR was more sensitive than in-house PCR, but there was another problems such as high false positive rate and high cost. So PCR may certainly become very useful in microbiological laboratories if PCR method is selected according to the laboratory conditions.

(Korean J Clin Microbiol 1999;2:144-151)

**Key words** : *Mycobacterium tuberculosis*, Polymerase chain reaction, Amplicor PCR, In-house PCR,

결핵은 1882년 Robert Koch가 처음으로 결핵균을 발견한 이래, 현재까지도 매우 높은 유병율을 보이고 있다[1-2]. 이는 결핵균의 높은 전염력 뿐만 아니라, 진단하는 검사법에 있어서도 민감도와 특이도가 만족스

럽지 못하며 검사 결과를 얻기까지 많은 시간이 소요되기 때문에 풀이된다. 따라서 결핵균 검사의 중요성과 더불어 검사 방법의 질적 향상이 절실히 요구된다. 결핵은 환자의 검체에서 결핵균을 직접 증명함으로써 정확한 진단이 가능하다. 그러나 현재 균 검출에 이용되고 있는 검사법들은 R. Koch가 결핵균을 발견할 당시에 창안되었던 방법에서 기본적으로 크게 달라지지 않았다. 결핵균의 존재를 알아보는 전통적인 방법으로 항산성 염색법과 배양법이 있다. 염색법은 특이도는 높으나 민감도가 떨어지며, 배양법은 배양 기간이 길어 진단에 이르기까지 오랜 시간이 걸리지만 아

원본접수 : 1999년 4월 9일      접수번호 : CM 99-2-1  
수정본접수 : 1999년 8월 27일  
교신저자 : 최윤미  
134-791 강동구 둔촌동 6-2  
한국보훈병원 임상병리과  
전화 : 02-2225-1459    Fax : 02-2225-1459

직까지도 가장 중요한 결핵균 검출 방법으로 이용되고 있다[3].

근래에 와서 분자 생물학의 발달로 결핵균에 대한 연구에 새로운 전기를 맞고 있다. Saiki 등[4]이 고안한 중합효소 연쇄반응법은 결과를 빨리 얻을 수 있을 뿐만 아니라 특이도와 민감도가 높다고 알려져 있어 다수의 임상 검체를 취급하는 검사실에서 각종 병원균 뿐만 아니라 결핵균의 검출 방법으로 널리 이용되고 있다[5-8]. 핵산 증폭 합성 기법의 통상적인 방법으로 내열성 중합효소로 균종 특이 핵산 절편을 증폭한 후, 전기영동으로 확인하는 방법과 16S rDNA를 증폭하여 horseradish peroxidase로 검출하는 Roche사에서 개발해 상품화한 Amplicor 제품, 16S rRNA로부터 결핵균을 검출하는 Gen-Probe사의 Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test라는 제품 등이 많은 임상적 평가를 거치고 있다[9-14]. 상품화된 제품은 사용하기 편리할 뿐만 아니라 질 관리면에서도 유리한 점이 많아 중합효소 연쇄반응에 필요한 시약을 만들어 사용하는 것에 비해서 고가의 재료비를 지불해야 한다는 점에도 불구하고 대형 검사실에서 손쉽게 이용되고 있다. 그러나 아직까지 우리나라의 많은 검사실에서는 DNA의 추출에서부터 반응 산물의 검출에 이르기까지 전 시약을 자가 제조하고 전기 영동법으로 확인하는 방법으로 원가를 절감하면서도 민감도와 특이도를 높이려는 노력을 하고 있다[15-19]. 핵산증폭 합성법은 위와 같은 장점에도 불구하고 중합효소 연쇄반응 후 산물의 오염, 결핵균 DNA의 오염 등으로 인한 위양성, 중합효소 연쇄반응 억제인자에 의한 위음성, 검사과정의 정교성으로 인한 수행능력의 차이, 고비용 등의 문제점이 제기되어 왔다[20-23]. 또한 검출하려는 대상 유전자의 종류와 증폭방법 및 증폭산물의 확인방법에 따라 민감도와 특이도에도 차이를 보일 뿐만 아니라, 연구 대상균에 따라서는 민감도와 특이도에서 많은 차이를 보이고 있다[13-16]. 이에 본 연구는 4년간 한국보훈병원 임상병리과에 결핵균에 대한 중합효소 연쇄반응이 의뢰되었던 임상 검체들 중 객담 검체 모두를 대상으로 배양 성적을 기준으로 항산성 염색 결과, 상품화된 Roche사의 Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit를 이용한 결과, 통상적인 방법으로 실시한 중합효소 연쇄반응법의 결과를 임상적 소견 등과 더불어 비교 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

1995년 7월부터 1999년 1월까지 한국보훈병원 임상병리과에 결핵균에 대한 중합효소 연쇄반응검사가 의뢰된 2,340건의 객담 검체에서 중합효소 연쇄반응 검사와 더불어 항산성 염색, 배양검사를 동시에 실시하

였다.

2. 연구방법

1) 객담 검체 전처리

50mL의 원추형 시험관에 객담과 동량의 2% NaOH 용액(4% NaOH 용액과 2.9% sodium citrate 용액을 동량 섞임)을 잘 혼합하였다. 객담이 잘 풀어지면 phosphate 완충액으로 50ml까지 채운 후 3,000g에서 20분간 원침하였다. 상층을 버리고 침사로 항산성 염색, 중합효소 연쇄반응검사와 배양검사를 실시하였다.

2) 항산균 염색 및 결핵균 배양방법

침사를 유리 슬라이드에 도말한 후 Ziehl-Neelsen법으로 항산성 염색을 실시하였다[24]. 200배 시야에서 전 영역을 검색하고 1,000배의 유침렌즈 시야에서 확인하는 방식으로 10분이상 관찰하여 American Thoracic Society의 기준에 따라 보고하였다. 검경하여 1+ 이상을 양성으로 판정하였다[25]. 결핵균 배양은 전처리한 검체를 3% Ogawa 배지(Eiken, Japan)에 접종하였고, 37℃에서 배양하였으며, 1주에 한번씩 8주동안 균 집락 유무를 관찰하였다.

3) 중합효소 연쇄반응법

1995년 7월부터 1997년 1월까지 의뢰된 1,314건에 대해서는 상품화된 Roche사의 Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 시행하였고, 1997년부터 1999년 1월까지 의뢰된 1,026건에 대해서는 다음과 같은 수지법으로 검체를 처리한 후 전통적인 중합효소 연쇄반응법을 실시하였다. 전처리된 객담의 침전물을 TE 완충액으로 2번 세척하였다.

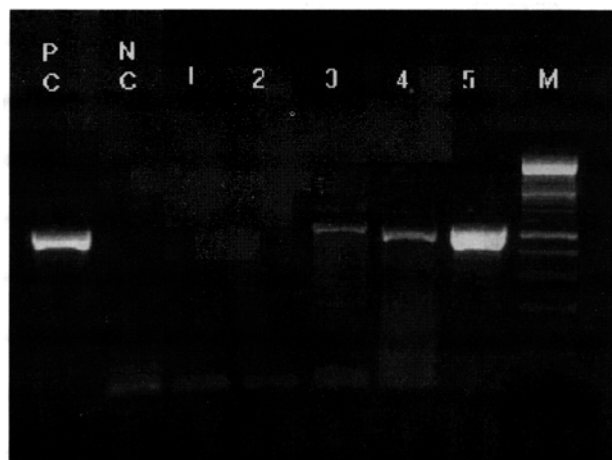


Fig. 1. Electrophoresis results of amplified products by using in-house PCR. 541 bp size of PCR products are visualized on lane 3, 4, 5. Lane M is DNA size marker, lane PC and NC are positive control and negative control, respectively.

InstaGene matrix(Bio-Rad, USA)를 넣어 잘 혼합하여 56℃에서 30분간 방치하였다. 잘 혼합한 후 100℃에서 10분간 끓였다. 15,000rpm에서 10분간 원심한 후 상층액을 중합효소 연쇄반응에 이용하였다. 분리된 DNA를 한쌍의 시발체(10 pmol/L)와 함께 중합효소 연쇄 반응액이 동결 건조된 premix tube(바이오니아, Korea)에 넣어 총량이 20ul가 되도록 증류수로 맞추었다. 자동 온도조절기(GeneAmp 9600, Perkin Elmer, USA)에서 94℃에서 1분, 68℃에서 3초, 72℃에서 1분간의 과정을 40회 주기로 반복 반응시켰다. 사용된 시발체는 insertional element IS986부위를 증폭시킬 수 있는 부위[26-27]로 바이오니아에 의뢰해 주문 제작하였다. 중합효소 연쇄 반응 후 산물을 2% 한천배지에서 전기 영동시킨 후 541 base pair의 띠가 관찰되면 결핵균 DNA 양성으로 판독하였다(Fig.1).

결 과

총 2,340건 중 항산성 염색에서 양성은 90건(3.9%)이

있고, 배양 양성은 185건(7.9%)이었다. 중합효소 연쇄 반응 양성은 222건(9.5%)으로 이중에는 Amplicor kit로 검출된 117건과 자가 제조한 중합효소 연쇄반응으로 검출된 105건이 포함되었다(Table 1). 배양 성적을 기준으로 민감도와 특이도를 살펴보면 항산성 염색법은 48.6%와 100%였으며, Amplicor는 87.7%와 96.3%였고, 자가제조에 의한 중합효소 연쇄반응법은 67.3%와 96.2%였다. 이들 결과를 항산성 염색 결과 별로 분류해 보면 Table 2와 같다. 배양검사를 기준으로 항산성 염색에서 양성이 나온 검체에서는 Amplicor의 민감도와 특이도가 97.4%와 100%, 자가제조 중합효소 연쇄 반응법이 92.3%와 100%였으나, 항산성 염색이 음성인 검체에서는 Amplicor의 민감도가 79.1%와 97.0%, 자가제조 중합효소 연쇄반응법이 42.3%와 97.3%였다. 이들 중 배양 검사결과와 중합효소 연쇄반응 방법간의 불일치를 보이는 경우에 대하여 병록지를 참조로 과거 경력, 진단 방사선학적 검사결과, 임상적 증상, 항결핵제 투여경력 등을 살펴보았다. 항산성 염색에서 양성이 나왔으나 배양결과와 중합효소 연쇄반응 결과

Table 1. Comparison of Amplicor PCR, in-house PCR and AFB stain with culture result

	Culture (No. of specimen)		Sensitivity(%)	Specificity(%)	PPV(%)
	Positive	Negative			
<b>AFB stain</b>					
Positive	90	0	48.6	100	100
Negative	95	2,155			
<b>Amplicor PCR</b>					
Positive	71	46	87.7	96.3	60.7
Negative	10	1,187			
<b>In-house PCR</b>					
Positive	70	35	67.3	96.2	66.7
Negative	34	887			

Table 2. Comparison of Amplicor PCR and in-house PCR with culture result according to AFB stain result

	Culture (No. of specimen)		Sensitivity(%)	Specificity(%)	PPV(%)
	Positive	Negative			
<b>AFB(+)</b>					
Amplicor			97.4	100	80.4
	37	9			
		0			
In-house			92.3	100	82.8
+	34	37			
	9	1,187			
<b>AFB(-)</b>					
Amplicor			79.1	97.0	47.9
	34	37			
	9	1,187			
In-house			42.3	97.3	46.8
+	22	25			
	30	887			

가 불일치를 보인 경우는 모두 전에 결핵균이 배양된 적이 있던 결핵환자였다. 항산성 염색결과, 음성을 보였고 배양결과와 중합효소 연쇄반응결과가 불일치를 보인 경우들에서는 다음과 같은 결과를 얻었다. 배양 결과는 양성이나 Amplicor PCR을 실시한 결과 음성을 보인 9건 중 6건은 전에 결핵균이 배양된 결핵환자의 검체였고, 3건은 비정형결핵균에 감염된 환자의 검체였다. 배양결과는 음성이나 Amplicor PCR이 양성인 37건 중 11건은 전에 결핵균이 배양된 적이 있는 결핵환자의 검체였고, 26건은 임상적으로나 과거 검사 결과 상 결핵과는 무관한 검체였다. 배양결과는 양성이나 자가제조 중합효소 연쇄반응 결과 음성을 보인 30건 중 20건은 전에 결핵균이 배양되었던 결핵환자의 검체였고, 8건은 비정형 결핵균에 감염된 환자의 검체였고, 2건은 결핵과 무관한 검체였다. 배양결과는 음성이나 자가제조 중합효소 연쇄반응 결과 양성을 보인 25건 중 16건은 결핵환자의 검체였고, 9건은 결핵과

무관한 검체였다. 이들 결과를 종합하여 민감도와 특이도를 다시 분석한 결과, 항산성 염색법은 50.0%와 100%였고, 배양법은 80.0%와 99.9%였고, Amplicor 중합효소 연쇄반응법은 92.9%와 97.9%였고, 자가제조 중합효소 연쇄반응법은 80.0%와 99.0%였다(Table 3). 또한 Amplicor 중합효소 연쇄반응 결과 중 항산성 염색이 양성이었던 검체의 민감도와 특이도는 97.9%와 100%였으나 항산성 염색이 음성이었던 검체는 88.2%와 97.9%였다. 자가제조 중합효소 연쇄반응 결과 중 항산성 염색이 양성이었던 검체의 민감도와 특이도는 93.6%와 100%였으나 항산성 염색이 음성이었던 검체는 65.5%와 99.0%였다(Table 4).

고 찰

본 연구는 각기 다른 시기에 방법이 다른 중합효소 연쇄반응을 실시하였기 때문에 중합효소 연쇄반응 성

Table 3. Comparison of culture, AFB, Amplicor PCR and in-house PCR after analysis of discrepant result

	Final positive	Final negative	Sensitivity	Specificity	PPV
<b>Culture</b>					
Positive	183	2	80.0	99.9	98.9
Negative	46	2,109			
<b>AFB</b>					
Positive	109	0	50.0	100	100
Negative	109	2,122			
<b>Amplicor</b>					
Positive	91	26	92.9	97.9	77.8
Negative	7	1,190			
<b>In house</b>					
Positive	96	9	80.0	99.0	91.4
Negative	24	897			

Table 4. Comparison of culture, Amplicor PCR and in-house PCR after analysis of discrepant result according to AFB stain result

	PCR	Final (+)	Final (-)	Sensitivity	Specificity	PPV
AFB(+)	Amplicor			97.9		
			46	0		
	In-house			93.6	100	100
			1	0		
AFB(-)	Amplicor			88.2	97.9	63.4
			58	0		
	In-house			65.5	99.0	80.9
			4	0		
+		45	26			
		6	1,190			
-		38	9			
		20	897			

적 간의 비교보다는 전통적 방법인 결핵균 배양 결과와의 비교를 통해 중합효소 연쇄반응 성적을 각각 평가하였다. 즉, 19개월간 1,314 건에 대해서는 Roche사의 Amplicor 상품을 이용하여 결핵균 DNA 검출을 실시하였고, 24개월간 1,026 건에 대해서는 primer와 반응산물의 검출시약은 자가 제조한 것을, 객담에서의 핵산추출 과정 시약과 중합효소 연쇄반응의 반응시약은 상품화된 제품을 사용하여 검사를 실시하였다. 임상 검체 중 특히 객담은 여러 가지 불순물이 많이 존재하기 때문에, 방해 인자에 매우 민감한 중합효소 연쇄반응을 수행하는데 있어서 검체 전처리 과정이 중합효소 연쇄반응을 성공적으로 수행할 수 있는 중요한 요인 중 하나이다. 이 등은 중합효소 연쇄반응을 억제시키는 인자가 많이 존재하는 객담을 처리하는데는 이온교환 수지법이 효과적이라고 보고하였으며[28] 서 등[15]은 Chelex 100을 이용한 이온 교환 수지법이 객담 처리에 효과적이라고 보고하였다. 주 등[16]은 객담에서 결핵균 DNA 추출법으로 InstaGene matrix(Bio-Rad, USA)를 사용할 경우 여러 억제 물질을 효과적으로 흡착할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 여러 가지 수지 교환법을 이용하여 객담을 처리해 본 결과, InstaGene matrix의 결과가 가장 우수하고 사용하기에 간편해 이 방법을 이용하여 객담 내에 있는 결핵균 DNA를 검출하였다.

중합효소 연쇄반응 산물의 검출 방법으로 일반적으로 쓰이고 있는 전기 영동법을 통한 검출 방법보다 민감도를 높이려는 시도로 검출 산물에 소식자를 붙여 확인한다거나, Amplicor 제품에서와 같이 발색 효소를 이용하거나 발광체를 이용해 검출된 산물을 증폭함으로써 민감도를 높일 수도 있을 뿐만 아니라 nested-PCR법을 통해 민감도를 높이려는 시도들이 있다[26,29]. 그러나 다량의 검체를 처리해야 하는 검사실에서 신속하고 간편하게 실시하기에는 번거로움이 있을 뿐만 아니라 검사의 성격상 여러 단계를 거치면 거칠수록 위양성의 위험도 높아 본 연구에서는 중합효소 연쇄반응의 단계를 되도록 간소화하기 위해서 Taq polymerase를 포함한 모든 반응 시약이 한 튜브에 동결 건조된 상품화된 제품에 저자들이 주문 합성한 primer와 증류수만 첨가하면 중합효소 연쇄반응을 시작할 수 있도록 하여 비용면에서 전과정이 상품화된 제품을 사용했을 때보다 약 5배의 비용 절감 효과가 있으면서도 반응 단계를 간소화시킴으로써 검사를 누구나 쉽게 실시할 수 있도록 하였다.

중합효소 연쇄반응의 유용성을 평가한 보고들을 살펴보면, 결핵균의 출현 빈도에 따라 중합효소 연쇄반응의 성적에 다소 차이가 있어서, 균양성이 10% 이상 섞여 있는 검체를 대상으로 통상적인 PCR 검사법에서의 민감도는 80-90%였으나[16,20], 균양성이 10% 미만인 섞여 있는 검체를 대상으로 평가한 Amplicor의

민감도는 70-88%로[13,14,21] 연구 방법뿐만 아니라, 연구군의 특성에 따라 민감도에서 차이를 보이고 있다. 또한 항산성 도말의 결과에 따라 중합효소 연쇄반응 성적에 차이를 보이고 있다. 결핵균의 출현 빈도가 9%인 균을 대상으로 2,073건에 대해 Amplicor PCR로 결핵균 검출 성적을 분석한 Carpentier 등[13]의 결과에 의하면 민감도가 86%이나 항산성 도말 음성의 검체인 경우 74%로 민감도에서 많은 차이를 보였으며, Bennedsen 등은 Amplicor PCR로 실시한 결과, 항산성 도말 양성 검체는 91.4%, 항산성 도말 음성 검체는 60.9%의 민감도를 보고하였고[30], Jonas 등[31]은 자가제조 방법에서 민감도가 82%였고, 도말 음성인 검체에서는 47%를 보고하였고, Pfyffer 등[32]은 민감도가 97%였고 도말 음성에서 75%를 보고하였다. 이와 같이 중합효소 연쇄반응 방법을 이용할 경우 도말음성 검체에서 그렇지 않은 경우에 비해 민감도가 현저히 낮음을 알 수 있다. 도말 검경을 기준으로 균 양성이 4.7% 섞인 검체를 대상으로 실험한 본 연구의 결과, Amplicor PCR의 경우, 불일치 소견을 분석한 후의 민감도는 92.9%였으나, 도말 음성인 군에서의 민감도는 88.2%였고, insertional element IS986 부위를 증폭한 자가 제조 중합효소 연쇄반응 검사결과의 민감도는 80.0%였으나 도말 음성인 군에서의 민감도는 65.5%였다. 이와 같은 결과는 상품화된 고가의 Amplicor PCR의 성적보다는 다소 떨어지지만 균 양성이 5-9% 섞인 검체로 평가한 다른 연구 결과에서의 민감도가 75-94%였고, 도말 음성인 군에서의 민감도가 47-53%로 보고된 것[13,14,21,32,33]과 비교했을 때 뒤지지 않는 결과로 풀이된다.

본 연구에서 배양 성적을 기준으로 중합효소 연쇄반응의 위음성을 분석한 결과, Amplicor에서 10건 중 1건만이 도말양성 검체로 과거에 결핵으로 진단받았던 환자의 검체였고, 9건은 도말음성 검체였는데 그중 6건은 결핵 환자의 검체였고 3건은 비정형 결핵균에 감염된 환자의 검체였다. 그래서 중합효소 연쇄반응의 실질적인 위음성은 7건으로 92.9%의 민감도를 보였다. 자가제조 중합효소 연쇄반응에서는 34건이 위음성이었고 그중 4건은 도말양성 검체로 결핵으로 예전에 진단받은 환자의 검체였고, 30건은 도말음성 검체로 20건은 결핵환자의 검체이고 8건은 비정형 결핵환자였고, 2건은 결핵과 무관한 환자의 검체였다. 그래서 실질적인 위음성은 24건으로 80.0%의 민감도를 보였다. 이와같은 결과는 자가 제조법으로 실시한 다른 연구 결과의 74%에서 85%까지 보고된 성적과는 비슷한 결과를 보였으나[17,18,20], Amplicor PCR법에 비하여 떨어지는 성적으로 이는 Amplicor에 비해 적은 양의 DNA를 첨가하기 때문에 도말 음성인 군에서 특히 많은 차이를 보인 것 같다. 또한 검체 처리 과정에서 중합효소 연쇄반응의 방해 물질이 완전히 제거되지 않았

을 가능성도 있어 반응시약 내에 internal control의 첨가도 고려해 보아야 할 것이다.

본 연구에서 배양검사를 기준으로 중합효소 연쇄반응의 특이도는 Amplicor가 96.3%였고 자가제조법이 96.2%였다. Amplicor에서 위양성 46건 중 20건이 예전에 결핵으로 진단받은 환자의 검체였고, 26건만이 도말검사도 모두 음성이며 결핵과는 무관한 환자의 검체였다. 따라서 실질적인 위양성은 26건으로 특이도는 97.9%였다. 자가제조의 경우 위양성 35건 중 26건이 결핵 환자였고 9건만이 도말검사도 모두 음성이며 결핵과는 무관한 검체였다. 따라서 실질적인 위양성은 9건으로 99.0%의 특이도를 보였다. Amplicor로 실험한 다른 보고들에서도 94%에서 99%의 특이도를 보고하였고[13,14,21] 이 등은 100%로 보고하였고[12], 주등[16]은 94.4%를 보고하였고, Bennedson 등[30]은 96%를 보고하였다. IS6100을 증폭시킨 Clarridge 등[17]의 결과에서는 96%를 보고하였다. 자가 제조로 실험한 다른 보고들에서 93%에서 99%의 특이도를 보고하였다. 위양성의 경우, 성장력이 없는 결핵균의 존재, 민감도가 낮은 배양결과를 기준으로 했기 때문, 또는 결핵균 DNA나 증폭산물의 오염 등을 생각할 수 있다. 본 연구에서는 자가 제조의 경우가 Amplicor보다 위양성이 현저히 적은 것으로 나타났다. 또한 nested PCR을 실시한 연구 결과에 비하여[15,29] 수행 과정이 간단한 본 연구의 자가 제조 중합효소 연쇄반응에서 위양성이 현저히 낮음을 보여 다량의 검체를 대상으로 중합효소 연쇄반응을 실시해야 하는 검사실에서는 민감도를 높이기 위해서 술식이 복잡하고 위양성의 위험도가 높은 nested PCR법보다는 통상적인 중합효소 연쇄반응 방법을 이용하는 것이 효율적일 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합할 때, 중합효소 연쇄반응 검사의 결과를 분석하는데 있어서 도말 음성인 검체에서의 민감도가 그렇지 않은 경우에 비해 많은 차이를 보이기 때문에 이에 대한 대책이 필요할 것으로 사료되며, 특이도에서도 상품화된 제품에서 자가 제조법에 비해 위양성이 많아 이에 대한 사항도 점검해야 할 것이다. 또한 결핵 환자의 효율적인 진단 및 관리를 위해서는 민감도, 특이도, 양성률, 음성 예측도, 필요시설 및 장비, 시약, 운용 비용, 기법의 복잡성, 재현성, 정도관리, 소요시간, 검사실의 규모, 일일처리 검체수 등을 고려해서 각기 병원의 실정에 맞는 적절한 검사 방법을 찾아서, 도말 검경, 결핵균 배양법과 중합효소 연쇄반응법을 상호 보완적으로 사용한다면 결핵의 정확하고 신속한 진단에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

배 경 결핵균의 검출을 위한 전통적인 방법으로

항산성 염색법과 배양법이 있으나 최근에 분자 생물학적 기법의 발달로 민감도와 특이도뿐만 아니라 신속성도 뛰어난 중합효소 연쇄반응법이 결핵균 검출에 널리 이용되고 있다. 본 연구는 각기 다른 시기에 실시한 상품화된 Amplicor PCR 제품과 자가 제조된 PCR 방법을 염색법과 배양법의 결과와 더불어 그 결과를 분석하고자 하였다.

방 법 : 총 2,340건의 객담을 대상으로 항산성 도말법과 배양법의 결과를 비교하였으며 1,340건의 객담 검체로 Amplicor PCR을 실시하였으며, 1,026건의 객담으로 자가제조 PCR을 실시하였다. Amplicor는 시약회사의 지시에 따라 실시하였고, 자가 제조 PCR은 수지법으로 DNA를 추출하고 제조된 시발체와 반응시약으로 중합효소 연쇄반응을 실시한 후 전기 영동법으로 확인하였다. 배양법을 기준으로 중합효소 연쇄반응 결과를 도말 양성률과 음성률로 분류하여 민감도와 특이도를 알아보았다.

결 과 : 배양법과 중합효소 연쇄반응 결과에서 불일치되는 경우를 분석한 결과, Amplicor PCR의 민감도와 특이도는 92.9%와 97.9%였고, 자가제조 PCR법은 80.0%와 99.0%였고, 배양은 80.0%와 99.9%였고, 항산성 도말법은 50.0%와 100%였다. 도말음성에서의 Amplicor PCR의 민감도와 특이도는 88.2%와 97.9%였고 자가제조 PCR법은 65.5%와 99.0%였다.

결 론 : 도말 결과에 따라 중합효소 연쇄반응의 민감도와 특이도에 많은 차이를 보이고 있었으며 상품화된 Amplicor PCR법의 민감도가 자가 제조법에 비해 우수했지만 위양성이 자가제조법에 비해 많았다. 따라서 결핵균 검출방법에 있어서 비용이 높은 상품화 제품과 저렴한 자가제조 방법을 검사실의 실정에 맞게 적절히 선택하여 도말법과 배양법을 병행해 실시할 경우 신속하고 정확한 결핵 진단에 도움이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 대한 결핵협회 결핵연구원. 7차 결핵실태조사 발견 환자 추구조사 결과. 1997.
2. 홍영표. 우리나라 결핵- 어제, 오늘, 내일. 결핵 및 호흡기질환 1997;44:1-10.
3. 김상재, 배한길, 황해도. 객담 내 결핵균 검출방법의 효율성 비교. 결핵 및 호흡기 질환 1989;36:354-60.
4. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermo-stable DNA polymerase. Science 1988;239:487-91.
5. Schluger NW, Kinney D, Harjub TJ, Rom WN. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to Mycobacterium

- tuberculosis. *Chest* 1994;105:1116-32.
6. Forbes BA, Hicks KES. *Direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol* 1993;31:1688-94.
  7. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. *Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis* 1991;144:1160-3.
  8. Brisson-Noel A, Aznar AC, Chureau C, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, et al. *Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. Lancet* 1991;338:364-66.
  9. Miller N, Hernandez SG, Cleary TJ. *Evaluation of Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test and PCR for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens. J Clin Microbiol* 1994;32:393-7.
  10. 나준, 허정원, 이성희, 김봉철, 고윤석, 배직현. Gene Probe법에 의한 *Mycobacterium tuberculosis* complex의 동정. *대한임상병리학회지* 1997;17:71-8.
  11. Bodmer T, A Gurtner, K Schopfer, L Matter. *Screening of respiratory tract specimens for the presence of Mycobacterium tuberculosis by using the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol* 1994;32:1483-7.
  12. 이명희. 결핵균 검출을 위한 Amplicor PCR kit의 평가. *대한임상병리학회지* 1996;16:364-72.
  13. Carpentier E, Drouillard Bm, Dailloux M. *Diagnosis of tuberculosis by Amplicor Mycobacterium tuberculosis test. J Clin Microbiol* 1995;33:3106-10.
  14. Schirm J, Oostendorp LAB, Mulder JG. *Comparison of Amplicor, in-house PCR, and conventional culture for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. J Clin Microbiol* 1995;33:3221-4.
  15. 서순팔, 허윤, 기승정, 신종희, 양동욱, 임상 검체에서 이중 중합효소 연쇄반응에 의한 결핵균의 검출. *대한임상병리학회지* 1995;15:60-73.
  16. 주세익, 조성임, 최혜심, 김의중. 임상 검체에서 상품화된 kit 시약을 이용한 결핵균 PCR 검사성적의 비교. *임상병리와 정도관리* 1997;19:237-44.
  17. Clarridge JE, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB. *Large scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol* 1993;31:2049-56.
  18. Kirschner P, Rosenau J, Springer B. *Diagnosis of mycobacterial infection by nucleic acid amplification: 18 month prospective study. J Clin Microbiol* 1996;34:304-12.
  19. Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, et al. *A more reliable PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. J Clin Microbiol* 1994;32:672-8.
  20. Roth A, Schaberg T, Mauch H. *Molecular diagnosis of tuberculosis : current clinical validity and future perspectives. Eur Respir J* 1997;10:1877-91.
  21. Stauffer F, Mutschlechner R, Hasenberger P. *Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical specimens by a commercial polymerase chain reaction kit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1046-51.
  22. Miura H, Ezaki T. *Detection of mycobacterial DNA by polymerase chain reaction method. Jpn J Clin Pathol* 1994;42:161-4.
  23. 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.
  24. Master RM. *Mycobacteriology. In :Isenberg HD, ed. Microbiology procedures handbook. Washington, D.C.: American society for microbiology* 1992:3.5.1-11.
  25. American thoracic society. *Diagnostic standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial disease. Am Rev Respir Dis* 1990;123:343-58.
  26. Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PWM, van Embden JDA, et al. *Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. J Clin Microbiol* 1992;30:2567-75.
  27. McAdam RA, Hermans PWM, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty S, van Embden, et al. *Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol Microbiol* 1990;4:1607-13.
  28. 이창규, 김영기, 이갑노. 결핵균의 중합효소 연쇄 반응을 이용한 결핵의 진단에 있어서 새로운 DNA 추출법. *대한임상병리학회지* 1996;16:689-95.
  29. Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, Kaku M. *Nested polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. J Clin Microbiol* 1993;31:2228-32.
  30. Bennedsen J, Thompsen VO, Pfyffer GE. *Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol* 1996;34:1407-11.
  31. Jonas V, MJ Alden, JI Curry, K Kamisango, CA Knott, R Lankford, et al. *Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum*

- sediments by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1993;31:2410-6.*
32. Pfyffer GE, P Kissling, R Wirth, R Weber. *Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens by target amplified system. J Clin Microbiol 1994;32:918-28.*
33. Noordhoek GT, Kolk AHT, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PEM, et al. *Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparisn study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994;32:277-84.*