

Comparison of Two Sputum Processing Methods for Detecting *Mycobacterium tuberculosis* by Culture and PCR: Universal Sample Processing (USP) and NALC-NaOH Methods

Hyeong-Kee Yun¹, Soo-Hyun Kim¹, Duck Cho¹, Seung-Jung Kee¹,
Myung-Geun Shin¹, Jong-Hee Shin^{1,2}, Soon-Pal Suh¹, Dong-Wook Ryang¹

¹Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Medical School and

²Clinical Trial Center, Chonnam National University Hospital, Gwangju, Korea

Background: The universal sample processing (USP) method has recently been introduced as a simple technique that is applicable to smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). The present study evaluated the utility of the USP method for detecting MTB by culture and PCR, and the results were compared with that of the N-acetyl L-cysteine (NALC)-NaOH (6%) method.

Methods: All sputum specimens were digested and decontaminated by both the USP and NALC-NaOH methods, and the processed samples were inoculated for MTB culture and PCR. Culture was performed (252 samples) by using the MGIT system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md, USA), and PCR test was conducted (281 samples) by using Amplicor MTB kit (Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J., USA).

Results: MTB culture positive rates by NALC-NaOH and USP methods were 13.5% (34/252) and 11.9% (30/252), respectively ($P>0.05$). There were no significant differences between the two methods for detecting MTB by PCR: the MTB PCR sensitivities by USP and NALC-NaOH methods were 77.8% (49/63) and 82.5% (52/63), respectively, and the specificities were 95.9% (209/218) and 96.3% (210/218), respectively ($P>0.05$).

Conclusion: There were no significant differences between USP and NALC-NaOH methods of sample processing in enhancing the detection of MTB by culture or PCR. (Korean J Clin Microbiol 2009;12: 67-71)

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, NALC-NaOH, MGIT, PCR

서 론

결핵을 진단하는 데 있어서는 환자의 임상증상 및 영상검사 소견 뿐 아니라 항산성 염색검사, 배양검사 및 중합효소연쇄반응검사(polymerase chain reaction, PCR) 등 임상 검체에서 직접 결핵균을 검출하는 검사가 매우 중요하다[1]. 결핵균 검출을 위한 검체로는 객담이 가장 많이 사용되는데 객담은 점액성이며 상재균에 오염될 확률이 높은 특성 때문에 항산성 염색, 배양 및 PCR 검사를 효과적으로 시행하기 위해서는 검체를 전처리하는 과정이 꼭 필요하다.

객담 전처리 방법으로는 일반적으로 N-Acetyl-L-Cysteine

(NALC)-NaOH법이 주로 사용되고 본원 미생물검사실에서도 결핵균 배양검사에 객담 전처리 과정으로서 NALC-NaOH법을 20년 이상 사용해오고 있으며, 2004년 3월 이후에는 결핵균 PCR 검사에도 동시에 사용하고 있다. 최근 Chakravorty와 Tyagi[2]가 결핵균 배양 및 PCR 검사를 동시에 시행하는 데 있어 사용할 수 있는 universal sample processing (USP)법을 소개하였고 그들은 USP법이 시약에 NaOH가 첨가되지 않아 중성 pH를 유지할 수 있고, PCR에 대한 증폭억제인자가 적은 장점 등으로 배양검사 및 PCR을 시행하는 데 매우 유용하다고 보고하였는데[2], 아직까지 두 가지 전처리법을 동시에 비교 분석한 보고는 없다.

이에 저자들은 새로 소개된 USP법이 병원 미생물검사실에서 유용하게 사용될 수 있는지 알기 위해 객담을 둘로 나누어 각각 NALC-NaOH법과 USP법으로 전처리를 시행한 후 결핵균 배양검사와 PCR검사를 시행하여 각각의 민감도 등을 분석하여 새로운 객담 전처리법의 효용성을 비교해 보았다.

Received 20 August, 2007, Revised 27 September 2007

Accepted 10 January, 2009

Correspondence: Soo-Hyun Kim, Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, 160, Ilsim-ri, Hwasun 519-809, Korea. (Tel) 82-61-379-7951, (Fax) 82-61-379-7984, (E-mail) alpinboy@hanmail.net

대상 및 방법

1. 대상

2006년 5월부터 12월 사이에 전남대학교병원 진단검사의학과에 결핵균 검출을 위해 의뢰된 객담 검체를 대상으로 하였다. 모든 객담 검체는 둘로 나누어 각각 USP법과 NALC-NaOH법으로 전처리를 시행한 후 배양 및 PCR 검사를 시행하였다. 총 252예를 대상으로 USP법과 NALC-NaOH법으로 전처리한 검체에 대한 배양검사를 시행하여 성적을 서로 비교하였고, PCR 검사는 총 281예를 대상으로 각각의 방법으로 전처리한 후 PCR을 시행하여 검사성적을 비교하였다.

2. 검체 전처리

1) NALC-NaOH법: 의뢰된 검체를 3~4 mL 정도 polypropylene 원추형 시험관(Thermo Fisher Scientific, Inc., Kamstrupvej, Denmark)에 넣고 총 10 mL가 되도록 6% NaOH (최종농도 1.5%), 0.5% NALC 및 2.9% sodium citrate를 첨가하고 혼합물을 진탕한 후 15~20분간 실온에 방치하였다. 그 후 phosphate buffered saline (PBS)로 50 mL까지 채운 후 4°C 냉장 상태에서 3,000×g에서 15~20분간 원심분리하였다. 분리 후 상층액은 조심스럽게 버리고 남은 침전물에 1~3 mL의 PBS를 첨가하여 혼합시킨 용액을 사용하였다.

2) USP법: USP법은 Chakravorty와 Tyagi[2]의 보고에 따라 시행하였다. 먼저 4~6 M guanidinium hydrochloride (GuHCl), 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 0.5% sarkosyl 및 0.1~0.2 M β-mercaptoethanol을 이용하여 USP 용액을 제조한 후 의뢰된 검체량의 1.5~2배를 첨가하였다. 혼합물을 진탕한 후 5~10분간 실온에 방치한 후 10~15 mL 멸균된 3차 증류수를 첨가하고 실온에서 5,000×g로 10~15분간 원심분리하였다. 분리 후 상층액은 조심스럽게 버리고, 이때 침전물의 양이 원래의 객담 양의 5~10% 정도로 감소되지 않는 경우에는 다시 2~5 mL USP 용액을 첨가한 후 원심분리를 반복하였다. 마지막으로 멸균된 3차 증류수로 세척하고 남은 침전물을 사용하였다.

3. 배양 및 종합효소연쇄반응검사

배양검사는 BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md, USA)을 사용하여 37°C에서 6주간 배양을 원칙으로 하였으며 양성을 보인 검체는 Kinyoun 항산염색법으로 선별 후 MycGen과 MPB70 염기서열을 표적으로 하는 시발체(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 in-house multiplex hot start PCR을 시행함으로써 결핵균과 비결핵마이코박테리아로 구분하여 보고하였다[3]. PCR 검사는 Roche Amplicor *M. tuberculosis* test (Roche Molecular Systems,

Branchburg, N.J., USA)를 사용하여 전 과정을 제조회사의 지시에 따라 시행하였다.

4. 통계 분석

각 검체 전처리법에 따른 배양 양성률 및 PCR의 민감도와 특이도의 차이에 대한 통계학적 유의성은 SPSS ver13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 McNemar's test를 통해 검정하였다.

결 과

MGIT 960 system을 사용하여 배양한 총 252 객담 검체 중 NALC-NaOH법으로 전처리 한 경우 34예, USP법으로 전처리 한 경우 30예에서 결핵균이 검출되어 결핵균 배양 양성률은 각각 13.5% (34/252) 및 11.9% (30/252)로서 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다($P>0.05$). 252 배양 검체 중 비결핵마이코박테리아가 배양된 경우는 NALC-NaOH법으로 전처리 한 경우 4.4% (11/252), USP법으로 전처리 한 경우 2.7% (7/252)로서 역시 유의한 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 그러나 결핵과 비결핵마이코박테리아를 포함한 모든 마이코박테리아가 검출된 검체는 NALC-NaOH법으로 전처리 한 경우 45예(17.9%), USP법으로 전처리 한 경우 37예(14.7%)로서 USP법이 NALC-NaOH법에 비해 유의하게 더 낮은 결과를 보였다($P<0.05$). 전체적으로 어느 하나의 전처리법에서라도 항산균이 검출된 예는 모두 45예(17.8%)였고 이 중 결핵균은 34예, 비결핵마이코박테리아는 11예였고 각 전처리법을 대상으로 실시한 배양검사에서의 오염률은 4~5% 내외를 유지하여 차이를 보이지 않았다(Table 1).

PCR 검사가 시행된 총 281 객담 검체에서 배양검사상 결핵균 및 비결핵마이코박테리아 양성은 각각 63예, 11예였다. 배양에서 결핵균이 배양된 63예 중 PCR 검사에서 결핵 양성으로 검출된 경우는 NALC-NaOH법으로 전처리한 경우 52예, USP법으로 전처리한 경우 49예였다. 한편 배양에서 비결핵마이코박테리아가 배양된 11예의 경우 두 전처리법 모두 PCR 검사에서 결

Table 1. MGIT culture results of 252 sputum specimens processed by USP and NALC-NaOH methods

Sputum processing method	No. of cultures	No. (%) of positive cultures for		
		<i>M. tuberculosis</i>	NTM	All mycobacteria
NALC-NaOH	252	34 (13.5)	11 (4.4)	45 (17.9)*
USP	252	30 (11.9)	7 (2.7)	37 (14.7)

Abbreviations: USP, universal sample processing; NALC-NaOH, N-acetyl-L-cystein-sodium hydroxide; NTM, nontuberculous mycobacteria.

* $P<0.05$, USP vs. NALC-NaOH method.

Table 2. PCR results for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in 281 sputum specimens processed by USP and NALC-NaOH methods

Culture results	No. of tested samples	PCR result (No. of samples)			
		USP		NALC-NaOH	
		Positive	Negative	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i> *	63	49	14	52	11
NTM	11	0	11	0	11
Negative	207	9	198	8	199
Total	281	58	223	60	221

*Sensitivity: USP (77.8%), NALC-NaOH (82.5%) ($P>0.05$), Specificity: USP (95.9%), NALC-NaOH (96.3%) ($P>0.05$).

Abbreviations: See Table 1.

결핵균 양성은 하나도 없었다. 배양결과를 기준으로 판정한 결핵균 중합효소연쇄반응검사의 민감도는 NALC-NaOH법과 USP법으로 전처리 후 각각 82.5% (52/63) 및 77.8% (49/63)였고, 특이도는 각각 96.3% (210/218) 및 95.9% (209/218)로 모두 유의한 차이를 보이지 않았다($P>0.05$)(Table 2).

고 찰

결핵은 전 세계적으로 2004년 기준으로 매년 인구 십만 명당 140명의 환자가 발생하고 결핵에 의한 사망자 수도 인구 십만 명당 27명이 될 것으로 추정되고 있다[4]. 우리나라의 경우도 2004년 기준으로 전 결핵의 신환 발생률은 인구 십만 명당 90명, 도말 양성 결핵은 인구 십만 명당 41명이 되는 것으로 추산되고 있어 지속적인 결핵예방, 환자발견, 등록 및 치료가 필요한 실정이다[5].

새로운 결핵환자의 발생은 주로 활동성 결핵을 가진 환자의 기침이나 재채기 등으로 인해 밖으로 나온 비말핵에 의해 전파되므로 활동성 결핵환자를 조기에 진단하여 치료하는 것이 결핵의 전염을 예방하는 데 중요하다고 알려져 있다[6].

결핵을 진단하는 데 있어서 환자의 임상증상과 영상검사뿐만 아니라 도말 현미경검사, 배양검사 및 PCR 등을 통해 임상검체에서 결핵균을 검출하는 것이 매우 중요하다[1]. 결핵 진단을 위한 검체로는 객담이 가장 많이 사용되는데 객담의 특성상 점액성이며 상재균에 오염될 확률이 높기 때문에 검사의 민감도 및 특이도를 향상시키기 위해서는 검체를 전처리하는 과정이 필요하다. 이러한 전처리법으로는 sodium hypochlorite, carboxypropylbetaine, chitin 및 phenol ammonium sulfate 등을 이용한 여러 보고가 있었으나 현재 NALC-NaOH법이 널리 이용되고 있다[7]. 국내의 경우 2000년 결핵균 검사 실태 조사에 참여한 64개 검사실 중 61개 검사실에서 2~4% NaOH를 검체 전처리에 사용하고 있었으며 이 중 13개 검사실(20.3%)에서 NALC를 첨가하여 사용한다고 보고하였고 이는 1996년 6개 검사실(15.0%)보다 증가하였다[8,9]. 본 병원 미생물검사실에서

도 2004년 3월 이후 결핵균 배양검사와 PCR법의 통합 검체 전처리법으로 NALC-NaOH법을 사용하고 있는데 최근 새로운 검체 전처리법이 보고되어 이의 유용성을 평가해보았다.

Chakravorty와 Tyagi[2]에 의한 새로운 검체 전처리법은 4~6 M GuHCl, 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 0.5% sarkosyl, 및 0.1~0.2 M β -mercaptoethanol을 이용한 방법으로, 이들에 의하면 USP법으로 검체를 전처리한 경우 항산성염색 검사에서 배경이 깨끗한 슬라이드 제작 및 항산균 검출 민감도가 증가하며, NaOH를 사용하지 않아 중화과정이 필요 없어 pH를 유지하기 쉬워 배양에 효과적이며, 증폭억제인자를 감소시켜 효과적인 PCR이 가능한 장점이 있어 각 검사실에서 결핵균 검사의 전처리법으로 유용할 것으로 보고하였다.

Chakravorty 등[7]의 보고에 의하면 객담을 USP법으로 전처리 후 시행한 배양검사에서의 결핵 양성률이 50.1%로 NALC-NaOH법의 53.6%와 유의한 차이를 보이지 않았다고 보고하였는데, 본 연구에서도 결핵균 배양 양성률은 USP법이 11.9%이고 NALC-NaOH법이 13.5%로서 두 전처리법 사이에 유의한 차이는 없었고 비결핵마이코박테리아가 배양된 경우도 각각 7% (7/252) 및 4.4% (11/252)로서 역시 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 본 성적에서 결핵균과 비결핵마이코박테리아의 모든 마이코박테리아를 대상으로 했을 경우 NALC-NaOH법이 17.9% (45/252)로 USP법 14.7% (37/252) 보다 더 높은 배양 양성률을 보였다. 본 연구에서는 전체적으로 Chakravorty 등[7]의 보고와 결핵 배양 양성률이 차이를 보였는데 이는 2005년, 2006년 본 검사실의 모든 마이코박테리아 배양 양성률이 각각 12.1% (899/7,457), 9.9% (1,037/10,514)인 점과 Chakravorty 등[7]이 결핵센터에서 수집된 객담을 대상으로 한 점을 고려하면 의뢰된 환자의 유병률 차이에 기인한 것으로 생각되었다. 또한 통계적인 유의한 차이는 없었지만 NALC-NaOH법이 USP법에 비해 더 높은 배양 양성률을 보여 배양에 있어서는 NALC-NaOH법이 USP법 보다 더 적합하다고 생각할 수도 있겠지만, 그 차이가 미미하며 NALC-NaOH법이 USP법에 비해 익숙한 방법인 점을 고려하면 추후 더 많은 검체를 이용한 연구가 필

요할 것으로 생각한다.

Chakravorty 등[7]은 객담 571예를 대상으로 USP법으로 전처리한 후 IS6110을 표적으로 하는 시발체를 이용한 PCR을 실시한 결과 결핵 배양 양성인 328예를 기준으로 할 때 민감도 및 특이도가 각각 99.1% 및 71.2%였다고 보고하였다. 그러나 이들은 NALC-NaOH법과의 비교는 시행하지 않아 저자들은 새로운 USP법이 검사실에서 사용되기 위해서는 두 가지 검체 전처리법을 직접 비교하는 것이 필요할 것으로 생각되어 본 연구를 기획하였다. 본 연구에서는 객담 281 검체를 둘로 나누어 각각의 방법으로 전처리하여 Roche Amplicor *M. tuberculosis* test를 이용한 PCR을 실시하였는데, 배양 성적을 기준으로 할 때 USP법의 민감도 및 특이도는 각각 77.8% 및 95.9%로 NALC-NaOH법의 민감도 및 특이도인 82.5% 및 96.3%와 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 호흡기 검체를 대상으로 Roche Amplicor *M. tuberculosis* test를 이용한 결핵균 검출에 관한 여러 보고에 의하면 배양검사를 기준으로 할 때 도말 현미경검사서 양성인 경우 90~100%, 음성인 경우 50~95.9% 및 종합적으로 83~96.7%의 민감도를 보인다고 알려져 있고 [10], 본 연구에서도 배양검사를 기준으로 할 때 NALC-NaOH법으로 전처리 후 시행한 항산성염색검사서 양성인 검체의 경우 PCR의 민감도는 95.2% (20/21), 음성인 검체의 경우 민감도가 76.2% (32/42)를 보여 이전의 보고와 유사하였다. 그런데, 본 연구의 전체적인 PCR의 민감도가 Chakravorty 등[7]에 비해 낮았는데 이는 Chakravorty 등[7]의 보고에서 배양검사상 결핵 양성인 170예 중 97.1%가 항산성염색검사서 양성인 것과 객담 검체가 결핵센터에서 수집된 것임을 고려하면 대상균의 유병률 차이 및 검사에 사용한 PCR 시발체의 표적 유전자가 다른 영향 등에 기인한 것으로 생각되었다.

그러나 민감도나 특이도는 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 USP법의 단점은 NALC-NaOH법에 비해 시약이 비싸며, USP 용액 1 L로 처리할 수 있는 검체 건수가 적어 검사비용이 상승하였으며, β -mercaptoethanol의 냄새가 심하고 sarkosyl 분말이 자주 날리는 제조상의 어려움이 있었다. 이러한 문제점들은 USP용액이 상품화된다면 해결될 수 있을 것으로 기대되지만 현재까지는 기존의 방법을 대체할 필요는 느낄 수 없었다.

결론적으로 최근에 소개된 호흡기 검체의 전처리 방법인 USP법은 결핵균 배양과 PCR에 있어서 NALC-NaOH법과 비

교하여 유의한 차이를 보이지 않았으나, 병원 미생물검사실에서 결핵 배양 및 PCR을 동시에 실시하기 위한 검체 전처리법으로 사용되기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(과제번호: A050174)에 의하여 이루어진 것임.

참고 문헌

1. Yang HY, Lee HJ, Park SY, Lee KK, Suh JT. Comparison of in-house polymerase chain reaction assay with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Korean J Lab Med 2006;26:174-8.
2. Chakravorty S and Tyagi JS. Novel multipurpose methodology for detection of mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens by smear microscopy, culture, and PCR. J Clin Microbiol 2005;43:2697-702.
3. Wilton S and Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. PCR Methods Appl 1992;1:269-73.
4. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006. WHO/HTM/TB/2006.362.
5. Kim HJ. Current situation of tuberculosis and its control in Korea. J Korean Med Assoc 2006;49:762-72.
6. Gaby E. Pfyffer. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: Patrick R. Murray, ed, Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC; American Society for Microbiology, 2007:543-72.
7. Chakravorty S, Dudeja M, Hanif M, Tyagi JS. Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2005;43:2703-8.
8. Chang CH, Park TS, Kim MN, Lee NY, Lee HJ, Suh JT. Survey on changes in mycobacterial testing practices in Korean laboratories. Korean J Clin Microbiol 2001;4:108-14.
9. Kim MN, Lee SH, Yang SE, Pai CH. Mycobacterial testing in hospital laboratories in Korea: results of a survey of 40 university or tertiary-care hospitals. Korean J Clin Pathol 1999;19:86-91.
10. Piersimoni C and Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol 2003;41:5355-65.

=국문초록=

결핵균 배양과 중합효소연쇄반응검사를 동시에 시행하기 위한 객담의 전처리법 비교 - Universal Sample Processing (USP)과 NALC-NaOH 법 -

¹전남대학교 의과대학 진단검사의학교실, ²전남대학교병원 임상시험센터
윤형기¹, 김수현¹, 조 덕¹, 기승정¹, 신명근¹, 신종희^{1,2}, 서순팔¹, 양동욱¹

배경: 결핵균 검출을 위한 도말 현미경검사, 배양 및 중합효소연쇄반응검사(PCR)를 동시에 시행하는 검체의 전처리법으로 최근 universal sample processing (USP)법이 소개되었다. 본 연구에서는 동일 객담 검체를 이용하여 결핵 배양 검사 및 PCR를 시행하는 데 있어 USP법과 N-acetyl L-cysteine (NALC)-NaOH법의 두 가지 전처리법을 비교하여 USP법의 유용성을 알아보려고 하였다.

방법: 모든 객담 검체는 둘로 나누어 USP법과 NALC-NaOH (6%)법으로 각각 전처리를 시행한 후 결핵 배양검사와 PCR을 동시에 시행하였다. 배양검사는 252 검체를 대상으로 BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md, USA)을 이용하였고, PCR은 281 검체를 대상으로 Roche Amplicor *M. tuberculosis* kit (Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J., USA)를 사용하였다.

결과: NALC-NaOH법과 USP법으로 각각 전처리 한 후 결핵균 배양 양성률은 각각 13.5% (34/252) 및 11.9% (30/252)로서 유의한 차이는 없었다($P>0.05$). NALC-NaOH법과 USP법의 결핵균 PCR의 민감도는 각각 82.5% (52/63) 및 77.8% (49/63)였고, 특이도는 각각 96.3% (210/218) 및 95.9% (209/218)로 두 방법 간에 유의한 차이는 없었다($P>0.05$).

결론: 새로운 검체 전처리법인 USP법은 NALC-NaOH법과 유의한 차이를 보이지 않았으나 검사실에서 기존의 방법을 대체하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다. [대한임상미생물학회지 2009;12:67-71]

교신저자 : 김수현, 519-809, 전남 화순군 화순읍 일심리 160
화순전남대학교병원 진단검사의학과
Tel: 061-379-7951, Fax: 061-379-7984
E-mail: alpinboy@hanmail.net