

## 진폐증 환자의 결핵진단을 위한 중합효소연쇄반응법의 임상적응용

문경제일병원 산업의학과, 내과\*, 임상병리과\*\*

박재희 · 임철재\* · 이경혜\*\*

— Abstract —

### Clinical Application of Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Pneumoconiotic Patient.

Jae-Hee Park, Chul-Jae Lim\*, Kyung-Hye Lee\*\*

*Department of Occupational Medicine, Internal Medicine\*, Clinical Pathology\*\*  
MunKyeong Cheil Hospital*

Recent development in the polymerase chain reaction (PCR) has brought an extraordinary opportunity for the rapid detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens for the diagnosis of tuberculosis. Pneumoconiosis is a sort of pulmonary fibrosis consequent to inhalation of the respirable dust. The association between pulmonary tuberculosis and pneumoconiosis is well recognized. There is a 10-fold increase in the tuberculosis risk among the workers who have pneumoconiosis demonstrated by chest roentgenogram.

The physicians managing the patients with pneumoconiosis have to maintain a high index of suspicion for the development of mycobacterial infection, since the diagnosis of tuberculosis is often difficult. *Mycobacterium tuberculosis* is a very slow growing organism and acid-fast bacillus (AFB) staining frequently shows false negative results, and therefore PCR would be a very rapid, easy and sensitive diagnostic method for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in pneumoconiotic patients. To compare the PCR method with the conventional methods in diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* in sputum, we used the sputa of 115 pneumoconiosis patients in MunKyeong Cheil Hospital. Of 32 pulmonary tuberculosis in the pneumoconiosis patients, 29 were PCR positive and were higher than 28, 20 positive by culture and AFB stain. Overall sensitivity, specificity, and which were 90.6, 91.5 % respectively for the PCR assay ; 87.5, 100 % for the culture method ; 62.5, 98.7 % for the AFB stain. The PCR assay is a rapid, efficient, sensitive method which can detect *M. tuberculosis* directly in pneumoconiosis patients, and further study should be followed for the development of the easier method.

**Key Words :** PCR, Tuberculosis, Pneumoconiosis

## 서 론

진폐증은 폐장내에 분진의 침착으로 야기되지만, 폐장내에 침착된 분진 모두가 병변화하지는 않기 때문에, '진폐증은 폐장내에 분진의 침착에 따른 폐의 조직반응'이란 정의가 널리 통용되고 있다(International labour office, 1972). 장기간의 분진 폭로자가 호소하는 호흡곤란, 기침, 다량의 담액 또는 흉통등의 호흡기 증상만으로는 진폐증이라 진단할 수 없고 침착된 분진에 의하여 폐의 조직반응인 섬유화가 관찰됨으로서 진폐증의 진단이 가능하다(윤임중, 1992). 과거 우리나라의 진폐증은 거의 모두가 광산 근로자에서 발생되었으나 근래에는 각종 제조업체의 분진 폭로자에서 뿐만 아니라 대기오염에 의한 진폐증이 일반주민에서 발생되고 있어 적지않은 사회문제로 지적되고 있다(장관식 등, 1987). 1997년 현재 전국에는 20개 의료기관에 약 2,000여명의 진폐증 환자가 폐기능의 악화상태, 진폐증의 진행정도, 그리고 합병증 등으로 요양중에 있으며, 직업병으로 판정된 진폐증환자수는 연간 약 540여명이며, 이로 인한 사망 예는 연간 약 280여명에 이른다(정호근, 1997). 진폐증의 합병증으로는 폐결핵, 결핵성 흉막염, 속발성 폐기흉, 속발성 폐기종, 속발성 폐기관지 확장증, 속발성 기관지염, 폐성삼 등이 있다. 근년에 항결핵화학요법의 발달로 결핵의 유병율이 현저히 떨어졌으나 대량의 분진침착으로 폐장의 방어기능이 저하되어 있는 진폐증환자에서는 보고자에 따라서 아직도 높은 합병율을 보고하고 있다(Vorward 와 Delahant, 1938). 진폐증에 합병되는 폐결핵의 진단은 상당히 어려운 것으로 알려져 있다. 기침, 발열, 야간발한, 무기력감, 호흡곤란 등의 결핵 고유증상들이 진폐증의 임상증상과 유사하며 흉부 X선 소견 역시 유사하여 임상적 진단을 어렵게 한다. 심지어 결핵진단의 가장 보편적 방법인 객담검사에서도 위음성의 출현이 높은 것으로 알려졌는데, 이는 결핵균이 섬유화 결절에 갇혀서 기관지로 균의 배출이 용이하지 않기 때문이다(Barras, 1970). 방사선학적 진단에서도 기존의 진폐증 음영에 의해서 결핵의 조기진단이 어려워져 진폐결핵의 진단을 위해서 주로 결핵균 배양법이나 항산성 염색법에 의존하여 왔다.

결핵균배양법은 표준검사법으로서 민감도가 염색법보다 높고 특이도 또한 100%로 알려져 있으나, 배양하는데 약 6-10주가 소요되고 검체당 10-100개 이상의 균이 생존하고 있을 때 배양되므로 임상적 진단에 이용하기에는 불편한 점이 많았다(김규태 등, 1974). 최근 Bactec법이 개발되어 배양기간을 단축시켰으나 잡균이 증식할 수 있으며 여전히 긴 진단 기간이 소요된다(Ellner 등, 1988).

항산균염색법의 민감도는 50% 내외이며 검체 1 ml당 10,000개 이상의 결핵균이 존재해야 검출할 수 있다. 또한 염색법의 단점으로는 검체내 균수가 적을 때는 오랜 검경시간이 소요된다고 한다(김규태 등, 1974). 그의 혈청학적 진단 및 결핵균에 대한 항원 혹은 항체를 검출하는 면역학적 진단법이 개발되었으나, 이 둘 방법은 비정형항산균 및 진균 등과 교차반응을 나타냄으로 특이도가 낮아 임상적 진단방법으로 더 이상 사용되지 않고 있다(유철규 와 심연수, 1991). 따라서 신속하고 민감도가 높은 결핵진단법이 요구되어 최근 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)을 결핵진단에 이용하게 되었다(Saiki, 1988). 이 방법은 DNA의 특정한 부위를 약 백만배 정도 증폭시킴으로 이론적으로 검체당 1개의 결핵균이 존재하여도 검출할 수 있으며 약 24시간의 진단기간이 소요되므로 신속하게 결핵을 진단할 수 있는 방법이다(서민호 등, 1991). 그러나 중합효소연쇄반응법은 위양성 및 위음성을 보일 수 있으며, 살아있는 결핵균과 죽은 균이 모두 양성으로 나타날 수 있으므로 결핵진단법으로 사용하기 위해서는 임상적 평가가 필요하다(조상래 등, 1990).

이 연구는 115명의 진폐증환자들의 객담을 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하고 항산성염색법과 배양법의 성적 및 환자들의 임상조건과 비교검토하여, 진폐결핵환자의 결핵균 검출법으로서 중합효소연쇄반응법의 민감도 및 특이도를 파악하고, 임상검사로서의 진단적 가치를 평가하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

1996년 1월부터 1997년 10월까지 문경제일병원 산업재해병동에 요양환자 및 외래환자 중 진폐증으로 진단된 115명의 객담을 채취하여 항산성염색법,

결핵균배양 그리고 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 환자들중 결핵으로 진단받고 항결핵제를 투여중인 환자는 대상에서 제외하였다. 충분한 양의 아침 첫 객담을 받아서 처리하였으며 검체처리가 지연된 경우에는 냉장보관하였다.

## 2. 연구방법

### 1) 검체 전처리

객담은 N-acetyl-cysteine-sodium hydroxide(NALC-NaOH)으로 탈오염시킨후 두 개의 원추형 시험관에 동량씩 분주하여 하나는 결핵균배양과 중합효소연쇄반응검사를 실시하고, 다른 하나는 항산성염색을 시행하였다.

### 2) 항산성염색법

원침한 침전물 50  $\mu$ 를 알콜처리된 슬라이드에 1.5×1.5 cm<sup>2</sup>으로 도말한 후 공기건조시켰다. 건조된 도말검체를 70 °C 슬라이드 건조대에서 1분간 고정 후 Ziehl-Neelsen법으로 염색하였다. 항산성염색의 결과판독은 잘 훈련된 두명의 검사자가 각각 검경하였으며 미국흉곽학회(ATS)의 기준에 따라 결과를 판정하였다(American thoracic society, 1990).

### 3) 결핵균배양법

NALC-NaOH로-탈오염시킨 검체를 3% ogawa 배지에 각각 500  $\mu$ 씩 떨어뜨려 접종한 후 37 °C에 배양하면서 1주에 한번씩 8주간 관찰하였다.

### 4) 중합효소 연쇄반응법

#### (1) 객담으로부터 DNA의 분리

객담으로부터 DNA를 분리하는 과정은, 객담 0.5-3 ml와 동량의 2% NaOH를 첨가하고 1분간 진탕기로 혼합한뒤, 37 °C 수조에서 5분마다 흔들며 주면서 15분간 정치하였다. 그후 원심분리하여 상층액을 제거하고 TEN완충액(10mM Tris HCl, 1mM EDTA, 150mM NaCl)을 넣어 부유시킨 후, 25  $\mu$ 의 phenol 및 chlorform isoamylalcohol(CIA)를 각각 첨가하고 bead를 100  $\mu$  수준까지 주입하여 bead-beater로 2분간 진탕하였다. 이를 다시 원심분리하여 상층액을 다른 시험관에 옮긴 뒤, 동량의 CIA를 주입, 재차 원심분리하여 상층액에 0.1배의 3M sodium acetate 와 3배의 무수넝

에탄올을 첨가하고 영하 20 °C에서 30분간 정치하였다. 형성된 DNA의 잔사를 실온에 두어 완전히 말린 다음, 30  $\mu$ 의 멸균증류수로 DNA를 녹였다.

#### (2) 중합효소연쇄반응과 증폭산물의 검출.

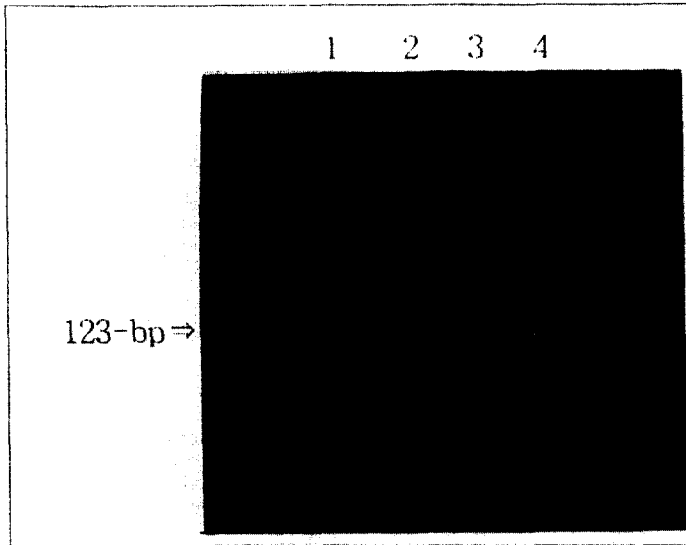
중합효소연쇄반응에 의한 결핵균 DNA의 검출은 Gene AmpR PCR kit(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)를 사용하였다.

시험관에 탈이온수 28.2  $\mu$ 을 주입하고, 100mM Tris HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.01% gelatin으로 구성된 10배의 중합효소 연쇄반응 완충액 5  $\mu$ , 200M의 dNTP 혼합물 4  $\mu$ , Ampli Taq DNA polymerase 0.3  $\mu$ 을 가한 뒤, *M. tuberculosis*에 특이도를 보이는 P1(5'-CCT-GCGAGCGTAGGCGTCGG-3') 및 P2(5'-CTCGT CCAGCGCCGCCGCTTCGG-3') primer를 각각 50 p mole과 객담에서 추출한 DNA 10  $\mu$ 를 주입하여 총 50  $\mu$ 의 반응혼합물을 준비한다음, 반응액의 증발을 막기위하여 mineral oil 70  $\mu$ 을 가하였다. 이 반응액을 DNA thermocycler에서 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 중합효소연쇄반응의 조건은 94 °C 1분간 열변성하고, 68 °C 2분간 결합시킨 뒤, 72 °C 2분간 중합반응을 40주기 반복하였으며, 40주기후 마지막 1주기에서는 중합반응을 10분으로 연장하였다. 중합효소 연쇄반응시 *M. tuberculosis H37Rv*의 DNA와 멸균 증류수를 넣어 양성 및 음성 대조로 사용하였다. 중합효소연쇄반응을 실시한후 반응산물 10  $\mu$ 를 취하여 전기영동완충액과 섞은 다음 ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 점적한후, 전기영동을 실시하여 123bp 크기의 DNA band 유무를 확인하였다(Fig. 1).

## 연구결과

### 1. 진폐증환자들의 항산성염색, 배양 및 중합효소 연쇄반응의 성적분석

진폐증환자 115명을 대상으로 객담검사를 실시한 결과를 표 1에 비교하였다. 항산성염색에서는 115명의 환자중 21예(18.7%)에서 결핵균 양성으로 나타났다으며, 배양검사로는 28예(24.3%)에서 결핵균이 배양되었으나, 중합효소연쇄반응검사로는 36예(31.3%)에서 양성으로 나타났다. 각 환자들에서



**Fig. 1.** PCR for *M. tuberculosis* with sputum samples. The amplified mycobacterial DNA sequence is visible on an agarose gel as a 123-bp band.

Lane 1: Molecular size marker.  
 Lane 2: Positive control, strain *M. tuberculosis*.  
 Lane 3: Negative control.  
 Lane 4: Positive PCR

**Table 1.** Comparison of results of microbiological and PCR techniques

PCR	Culture	AFB stain	No. of Patients(%)
+	+	+	16( 13.9)
+	+	-	9( 7.8)
+	-	+	3( 2.6)
+	-	-	8( 6.9)
-	+	+	1( 0.8)
-	+	-	2( 1.7)
-	-	+	1( 0.8)
-	-	-	75( 65.2)
<b>Total</b>			<b>115(100.0)</b>

PCR: polymerase chain reaction

+: positive - : negative

AFB: acid-fast bacillus

실시한 세가지 방법을 비교한 결과, 총 115예 중 세가지 검사에 모두 양성인 예는 16예(13.9%)였으며, 75예(65.2%)는 모두 음성이었다. 중합효소연쇄반응법 및 배양법에 양성인 예는 9예(7.8%)였고, 중합효소연쇄반응법 및 염색법에 양성인 예는 3예(2.6%)였다. 중합효소반응법으로만 양성인 예는 8예(6.9%)로 나타났다. 반면에 1예(0.8%)에서는 배양법 및 염색법에 양성이고, 2예(1.7%)에서는 배양법에만 양성이고, 1예(0.8%)에서는 염색법에만 양성으로 나타났다.

**Table 2.** Analysis of cases with discrepant test result

PCR	Culture	AFB stain	Clinical diagnosis
+	-	-	7 : Non Tbc 1 : Endobronchial Tbc
+	-	+	3 : Tbc
-	+	+	1 : M. O. T. T.
+	+	-	9 : Tbc
-	-	+	1 : Non-Tbc
-	+	-	2 : M. O. T. T.

M. O. T. T.: mycobacterium other than tuberculosis

## 2. 검사방법간의 결과가 불일치된 환자의 검토

세가지 검사방법상 서로 일치되지 않은 결과를 보인 환자들의 임상적 소견을 조사하였다. 중합효소연쇄반응법으로만 양성인 8예의 환자들의 임상적 소견을 살펴보면 3예의 환자는 결핵의 과거력이 있고 항결핵제를 얼마전까지 복용하였던 환자로, 중합효소연쇄반응법에 의해 검출된 *M. tuberculosis* DNA가 결핵치료의 실패로 인한 재활성화과정(reactivation process)에서 검출된 생균(live tubercle bacilli)인지, 아니면 항결핵요법으로 인해 사균(residual dead bacilli)이 검출되는지 판단하기란 어려웠다. 그러나 3예의 환자는 흉부X선상 병소가 안정화되어있으면서 임상증상이 없어 사균의 검출로

판단하였다. 4예의 환자는 결핵의 과거력이 없고, 흉부X선소견에 결핵을 의심할만한 병변이 없으면서, 임상증상 역시 결핵이 의심되지않아 중합효소연쇄반응법을 위양성으로 처리하였다. 이중 2예의 환자는 세균성 폐렴으로 확진되었다. 결핵이외의 호흡기질환에서도 중합효소연쇄반응법에 양성을 보일 수 있다는 보고가 있는데(Des perez 등, 1990), 교차오염(cross contamination)에 의한 위양성인지 결핵이외의 호흡기질환에서 보일 수 있는 위양성인지 판단하기란 어려웠다. 나머지 1예의 환자는 흉부X선상 우상엽의 무기폐(athlectasis)소견을 보여 기관지 내시경을 실시하였고, 조직검사에서 결핵소견을 보여 결핵환자로 간주하였다.

중합효소연쇄반응법과 항산성염색검사에만 양성소견을 보인 3예의 환자는 항결핵요법을 자의로 중단한 만성결핵환자로, 이전 검사상 결핵균이 동정되었고 임상적으로 확인한 결핵환자로서 배양검사를 위음성으로 간주하였다. 1예의 환자에서는 배양검사 및 도말검사에만 양성인 환자로서 배양검사에서 *M. kansasii*가 동정되어 중합효소연쇄반응법을 위음성으로 판정하였다. 중합효소연쇄반응법 및 배양법에만 양성을 보인 9예의 환자들은 항산성 염색검사를 위음성으로 판단하였다. 도말법에만 양성인 1예의 환자는 조사 3개월전에 항결핵요법을 마친 환자로, 이전 검사상 결핵균이 분리된적이 없고 임상적으로 결핵의 재발이 의심되지 않아 도말법을 위양성으로 처리했다. 배양법에만 양성인 2예는 비정형결핵균이 동정되어 중합효소연쇄반응법과 염색법을 위음성으로 처리하였다.

### 3. 각 검사방법간의 결핵균 검출 성적 비교

각 검사방법의 특이도 및 민감도는 결핵의 진단기준에 따라 확연한 차이를 보일 수 있다. 본 연구에서 결핵의 진단은 배양법에 근거하여 판정하였으며, 배양법에 음성인면서 항산성염색법이나 중합효소연쇄반응법에 양성인 경우는 임상증상, 흉부X선 소견, 이전 검사상 결핵균 분리여부, 조직검사소견, 항결핵제 투여여부를 종합하여 판단하였다. 결핵으로 판정한 환자는 전체 115예중 32예였으며, 29예에서 중합효소연쇄반응법 양성, 28예에서 결핵균배양상 양성, 20예가 항산성염색법에 양성소견을 보였다(Table 3).

각 검사간의 특이도, 민감도 및 예측치를 비교하

**Table 3.** Comparison of result of microbiological and PCR technique with clinical diagnosis

	PCR		Culture		AFB stai(n)	
	+	-	+	-	+	-
Silicotuberculosis(32)	29	3	28	4	20	12
Pneumoconiosis(83)	7	76	0	83	1	82

**Table 4.** Sensitivity, Specificity and Predictivity of PCR, Culture and AFB stain.

	PCR	Culture	AFB stain
Sensitivity(%)	90.6	87.5	62.5
Specificity(%)	91.5	100	98.7
Positive predictive Value(%)	80.5	100	95.2
Negative predictive Value(%)	97.4	95.4	87.2

면 아래의 표와 같다(Table 4).

가장 높은 민감도를 보인 검사는 중합효소연쇄반응법이었으며 중합효소연쇄반응법에서는 7예에서 위양성으로 나타나 91.5 %의 특이도를 보였으나 항산성염색법과 배양법에서는 100 %에 가까운 특이도를 보였다.

중합효소연쇄반응법의 성적은 연구자에 따라 민감도는 63-100 %, 특이도는 62-100 %로 다양하게 보고하고 있다(Gerda 등, 1989; Pao 등, 1990; Cousins 등, 1992; Thomas 등, 1994; Gaby 등, 1994). 이러한 민감도의 차이는 다음 4가지 요인에 의해 좌우된다고 생각되고 있다. 1) 검사방법의 분석적 민감도, 2) 표준검사인 배양법의 민감도, 3) 검사에 포함된 양성검체의 분포도, 4) 약약성 검체인 경우에 특히 문제가 되는 검체내 균분포의 불균질성의 요인들이다(Jonas 등, 1993). 본 연구에서 중합효소연쇄반응법의 민감도는 90.6 %로서 조사한 세가지 검사법중 가장 높았으며, 그 원인은 본 연구에서 시행한 중합효소연쇄반응법에 비해 배양법이 상대적으로 낮은 민감도를 보였기 때문인 것으로 추측된다. 중합효소연쇄반응법의 특이도는 검체간 교차오염에 의한 위양성율이 높아 다소 낮은 것으로 보고되고 있는데 본 연구에서도 특이도가 91.5 %로

새가지 검사방법중 가장 낮은 성적을 보였다.

## 고 찰

결핵균 감염에 의한 발병은 적절한 치료제 및 치료법의 개발과 적극적인 예방대책으로 많이 감소되고 있는 실정이다. 1995년 실시한 제 7차 전국결핵실태조사에서는 엑스선상 활동성 폐결핵 유병율은 1.0%, 균양성(도말 또는 배양)폐결핵 유병율은 0.22%이었다(대한결핵협회, 1995).

직업별 활동성 폐결핵 유병율중 광부 및 채석업의 유병율이 9.1%로 가장 높았으나, 조사대상자가 11명에 불과하여 본 연구의 결과를 일반화하는데 무리가 있다.

1930년대 미국에서는 60%의 규폐환자에서 폐결핵이 합병하였음을 보고하였고(U.S. Public Health Service, 1961) 우리나라는 1960년대 26.8%(이경근, 1967), 1970년대 2.4%(윤임중, 1977), 유고슬라비아는 9.1%(Popovic, 1971), 인도는 3.6%(Viswanthan, 1971)를 보고한 바 있다. 결핵의 위험도면에서는 복합분진 진폐증(mixed dust pneumoconiosis) 환자에서 보다 규폐증환자에서 더욱 높은 것으로 알려져 있다. Dixie(1978)는 규폐증과 폐결핵의 합병율에 영향을 주는 인자들로 인구의 결핵유병율, 인구의 연령 및 건강상태, 결핵 예방 사업, 결핵진단 방법, 결핵진단 기준 등을 제시하였으며 규폐증에 폐결핵이 잘 합병되는 이유를 다음과 같이 설명하였다. 즉, 흡입성 분진이 폐포에 도달하면 대식세포에 의하여 탐식되어 분진입자는 macrophage phagosome 속에 있게 되고, 분진입자에서 생성된 독성물질로 인해 phagosome이 파괴되어 유리규산분진은 세포질내에 존재하게 된다.

Phagosome이 파괴될 때 lysosomal enzyme이 유리되는데 이 효소는 대식세포를 빨리 사멸시키고 용해된 대식세포와 세포질내의 유리규산입자는 다른 대식세포에 의하여 위와 같은 과정을 반복하게 되어 섬유아세포의 증식과 교원질의 생성을 초래하며, 대식세포의 기능장애와 사멸 때문에 결핵감염이 용이하게 된다는 것이다(Dixie, 1978).

진폐증환자를 관리하는 의사에게는 항상 결핵합병에 대한 가능성을 숙지시키고 결핵합병에 대한 빠른 진단을 하는 것이 진폐증환자의 예후와 밀접한 관계

가 있다. 그러나 진폐증환자에서는 결핵의 조기발견이 때때로 어려운 것으로 알려져 있는데, 이는 결핵균 자체가 섬유화된 병소안에 갇힘으로써(walled off) 객담검사결과의 위음성율이 높고, 진폐증의 임상증상과 결핵의 증상이 중복되는 면이 많아 임상적 진단이 어렵기 때문이다.

방사선학적 진단이 비교적 조기발견이 쉽다고 하나, 결핵의 방사선 소견과 진행된 진폐증의 소견이 유사하여 방사선상 조기변화를 감지하여야만 결핵진단이 용이하게 된다. 이러한 이유로 연구자는 최근 결핵진단에 많이 연구되고 있는 중합효소연쇄반응을 진폐증환자에 병발한 결핵진단에 임상응용할 수 있는지 조사하였다.

중합효소연쇄반응법은 1985년 Saiki 등에 의하여 처음으로 임상진단에 도입되었으며, (Saiki 등, 1985) 내열성의 DNA 중합효소에 의하여 원하는 DNA만을 증폭함으로써 백만개의 세포중 1개의 표적세포가 있어도 검출할 수 있는 진단방법이다. 중합효소연쇄반응의 한 주기는 열변성, 시발체 결합 및 중합반응의 세 단계로 이루어지는데, 이를 30-40회 반복함으로써 원하는 양만큼 DNA를 증폭시킨다. 최근에는 중합효소연쇄반응의 산물을 정량적으로 분석하여 중합효소 연쇄반응의 민감도와 특이도가 높아졌다. 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균의 검출은 1989년에 처음으로 보고 되었다. 결핵균의 65KD항원을 coding하는 DNA중 383bp의 DNA 분절을 증폭시켜 사용하였는데 표준균주를 이용한 실험에서 높은 민감도와 특이도가 관찰되었다(Brisson-Noel 등, 1989). 결핵균은 약 3,000 Kb의 염색체성 DNA를 가지며, 원형질막밖에 내적으로 이루어진 세포벽에 약 60%의 지질을 함유하고 있어 일반 세균에 비해 DNA를 추출하기가 쉽지 않다. 본 연구에서는 결핵균의 DNA를 추출하기 위해 bead-beater법을 이용하였는데 가장 신속하고 예민한 방법으로 보고되어 있어 본 연구에서도 이 방법을 사용하였다(윤경한 등, 1991). 결핵균의 DNA를 증폭시키는데 이용하는 DNA표적으로는 결핵균의 특이한 항원을 결정짓는 유전인자를 목표로 하는 방법, 민감도를 증가시키기 위하여 결핵균에만 나타나며 특이적으로 반복되는 연속유전인자를 증폭하는법, 그리고 ribosomal RNA를 증폭시키는 방법 등으로 요약할 수 있다. Eisennach(1988)등은 결

핵균의 DNA를 제한효소 Mbo I으로 처리해서, bacteriophage M13에 clone하여 결핵균에만 특이한 세 개의 DNA 분절을 발견하였다. 이중 123bp의 DNA 분절을 중합효소연쇄반응으로 증폭시켜 gel electrophoresis를 걸면 결핵균, *M. bovis*와 *M. simiae*에서만 123bp의 DNA 분절이 발견되고 비정형항산균에서는 발견되지 않아 임상검체에서 결핵균의 검출에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다. 이때 사용된 123bp의 DNA분절은 결핵균의 염색체내에 10-16번 정도 반복적으로 존재하기 때문에 반복되지 않는 DNA 분절을 사용했을 때 보다 민감도가 증가한다. 따라서 본 연구에서는 결핵균 진단의 민감도가 높고 시발체 내에 75 %의 guanine+cytosine를 함유하여 결합온도가 높아, 특이성이 높은 IS6110 구조의 일부인 123 bp를 증폭하였다. 본 연구에서 중합효소 연쇄반응법과 배양법 및 항산성염색법의 결과를 비교 관찰하여 본 결과 진폐결핵의 진단검사로서 중합효소연쇄반응은 우수한 민감도를 나타내었다. 임상검체에서 결핵균의 중합효소연쇄반응을 실시한 다른 보고에 의하면, 중합효소연쇄반응은 항산성염색법에 비하여 1.0배에서 4.7배의 민감도를 보였으며(Thierry 등, 1990; Shankar 등, 1990; Pao 등, 1990; 김호중 등, 1992), 본 연구의 결과에서는 약 1.45배의 민감도를 나타내었다. 또한 본 연구에서 중합효소연쇄반응법은 결핵균배양법 보다 약 1.03배 민감하게 나타났는데 다른 보고에서도, 본 연구의 결과와 유사한 1.0-1.3배의 민감도를 나타내었다. 따라서 후천성 면역결핍증이나 백혈병, 신부전, 진폐증 등과 같이 면역기전이 저하되어 있는 경우, 빠른 진단이 환자의 예후와 직결되는 상황에서는 PCR이 임상적으로 유용할 것으로 기대되나 이를 임상에 응용하는데는 몇가지 문제점이 지적되어 왔다.

첫째로 배양된 균주로 실험한 결과와 임상검체로 실험한 결과간의 감수성의 차이가 약 1,000배정도 존재한다는 점이다. 즉 임상검체에서 분리한 DNA 내에 PCR을 방해하는 물질이 존재함으로써 DNA의 복제가 비효율적으로 일어난다는것인데 이러한 물질로는 hemoglobin과 sodium dodecyl sulfate 등이 있다(김호중 등, 1992).

둘째는 오염(contamination)이라는 문제점으로 PCR의 근본을 유지시키는 중요한 관건으로서

이의 방지를 위하여 여러 가지 방안이 제시되고 있으나 아직도 불완전한 실정이다. 즉, 비교적 적은 분자량의 DNA를 다량으로 복제한 후 전기영동하는 과정을 반복하게 되는데 PCR 자체가 매우 예민하여 극미량이 오염되더라도 위양성으로 나오는 것이다. PCR에서는 오염은 손끝이나 pipet tip을 재생하여 사용하는 tube 등에 의한 접촉오염과 복제된 DNA가 비말핵으로 pipet내에 계속 존재하거나 공기중에 떠다님으로써 발생하는 복제자 오염으로 나눌수 있다. 접촉 오염은 시약이나 검체의 취급을 매우 주의 있게 함으로써 숙련된 연구자들은 어느정도 예방이 가능하나 복제자 오염은 일단 오염되면 회복이 어렵고, 실험 양과 기간에 비례하여 오염도가 증가한다는데 그 심각성이 있다(김호중 등, 1992).

세번째 문제점은 작은 결핵균도 양성으로 나오는 점으로 PCR의 장점이 될 수도 있다. PCR의 양성반응은 결핵균의 어떤 특정 부위의 DNA가 존재한다는 것이지 결핵의 감염과는 다른 개념으로서 임상적인 판단이 필요하며 몇 주간 항 결핵제를 투여 받은 환자의 검체에서도 양성을 나타낼 수 있음이 확인되고 있다(Pao 등, 1990).

## 결 론

진폐증 환자의 결핵진단을 위한 중합효소연쇄반응법의 임상적 유용성을 알아보기 위해, 문경제일병원에 내원한 115명의 진폐증환자를 대상으로 객담을 채취하여 중합효소연쇄반응, 항산성염색 및 결핵균 배양을 실시하였다.

이 결과들을 환자들의 진단에 따른 임상적 소견과 비교 검토하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 진폐결핵환자 32예중 중합효소연쇄반응법은 29예에서 양성을 나타내어 90.6 %의 민감도를 보였고, 비결핵환자의 검체를 대상으로 검사한 결과 특이도는 91.5 %를 나타내었다.

2. 중합효소연쇄반응법은 진폐결핵의 발견을 위한 민감도에서 항산성염색법이나 배양법에 비해 우수하였으며 특이도에서도 상당히 신뢰할 만 하였다. 이상의 결과를 살펴보면, 약 24시간의 검사기간이 소요되는 중합효소 연쇄반응법은 우수한 민감도와 특이도를 나타내어 진폐증환자의 결핵 진단을 위한 검사법으로서 임상적으로 유용하게 사용될 수 있을것

으로 판단된다.

## 인용문헌

- 김규태, 김성진, 안성규. 결핵환자 발견을 위한 직접도말 현미경검사방법의 실험적 소고. *결핵 및 호흡기질환* 1974;21:149-155
- 김호중, 김영환, 한성규, 심영수, 김건열, 한용철. PCR을 이용한 결핵의 진단에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 1992;39:517-525
- 보건복지부, 대차결핵협회. 제 7차 전국결핵실태조사. 1995.
- 서민호, 백원기, 이규석. 임상검체에서 PCR을 이용한 수두-대상포진 바이러스 DNA의 검색. *대한미생물학회지* 1991;26:479-486
- 유철규, 심영수. 결핵의 진단. *대한의학협회지* 1991;34(5):484-498
- 윤경환, 이태운, 조상래, 김득순, 정동현, 김주덕. 가검물 내 결핵균검출에 있어서 DNA 분리방법에 따른 중합효소연쇄반응의 민감도 비교. *대한미생물학회지* 1991;16:159-166
- 윤임중. 한국 탄광부들에 있어서의 진폐증의 유행을. *결핵 및 호흡기질환* 1977;24:1-9
- 윤임중. 우리나라 진폐증의 현황. *결핵 및 호흡기질환* 1992;39(5):375-379
- 이경근. 한국탄광에서 발생된 규폐의 역학적 연구. *카롤린 대학의학부논문집* 1967;13:102-126
- 장관식, 김희진, 안동일, 유남수, 조동일, 김재원. 공해지역(연탄공장주변)주민에 게서 발견된 탄분침착증 1예. *결핵 및 호흡기질환* 1992;39(5):250-253
- 조상래, 이태운, 윤경환, 정동현, 정운섭, 김주덕. 중합효소연쇄반응을 이용한 가검물내 M.tuberculosis 의 검출. *대한미생물학회지* 1990;25:491-499
- 정호근. 진폐의 예방과 관리. 서울: 태흥문화사, 1997.
- American thoracic society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial disease. *Am Rev Respir Dis* 1990;123:343-358
- Barras G. Silico-tuberculose en suisse. *Schweiz Med Wochenschr* 1970;100:1802
- Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Friebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989;2:1069-1071
- Cousins DV, Wilton S, Francis B, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:255-258
- Des perez M, Heim CR. *Mycobacterial tuberculosis. Principles and practice of infectious disease.* New York: Churchill Livingstone, 1990.
- Dixie ES. The relationship between tuberculosis and silicosis. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:455-459
- Eisennach KD, Crawford JT, Bates JH. Repetitive DNA sequences as probes for mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2240-2245
- Ellner PD, Keith TE, Cammarata R, Hosmer M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* 1988;26:1349-1352
- Gaby EP, Paschle K. Direct detection of M.tuberculosis complex in respiratory specimens by target amplified test system. 1994;32:918-923
- Gerda TN, Arenp HJ. Sensitivity and specificity of PCR for detection of M.tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1989;32:277-284
- International labour office. The definition of pneumoconiosis. New York : McGraw Hill, 1972.
- Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Kott CA, Moore DF. Detection and identification of M.tuberculosis directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993;31:2410-2416
- Marvin RB, Susan LW, Daniel EB. Clinical aspects of coalworker's pneumoconiosis and silicosis. *Occupational medicine:State of the Art Reviews* 1993;8(1):19-35
- Pao cc, Benedict YT. Detection and identification of M.tuberculosis complex strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:1204-1213
- Popovic D. Epidemiology of pneumoconiosis in Yugoslavia. 4th International Pneumoconiosis Conference. Bucharest. 1971;41-42
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S. Primer directed DNA enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491
- Saiki RK, Scharf S, Fallona F. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354
- Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, Aditi B, Seth P, Shrinivas. Identification of M.tubercu-



- losis by polymerase chain reaction. *Lancet* 1990; 335:423
- Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Leve Frebaule V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *M. tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2668-2673
- Thomas B, Anderea G. Screening of respiratory tract specimens for the presence of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1994;32:1483-1487
- U.S. Public Health Services. *Silicosis in the mining industry*. U.S. Public Health printed 1961:9-10
- Viswanthan R. Survey of respiratory morbidity including pneumoconiosis among coalminers. 4th International Pneumoconiosis Conference. Bucharest. 1971:31-42
- Vorward AJ, Delahant AB. Influence of silica on natural and acquired resistance to tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc* 1938;38:347