

중합효소연쇄반응을 이용한 늑막액과 늑막생검조직에서의 결핵균 DNA 검출*

계명대학교 의과대학 내과학교실 및 미생물학교실**

한승범 · 허정숙 · 전영준 · 백성덕** · 백원기** · 서민호**

서 론

결핵성 늑막염은 객담, 늑막액, 늑막생검조직에서 결핵균을 검출^{1~3)}하거나 늑막조직에서 유탄종을 증명함으로써 진단이 가능하고 늑막액의 세포학적 성상이나 생화학검사소견¹⁾도 보조적 수단으로 이용될 수 있다. 객담도말검사로 결핵균을 검출하는 것은 간편하고 신속하게 시행할 수 있지만 감수성이 낮고 특히 결핵성늑막염환자의 늑막액에서는 10%미만에서 양성^{1,4)}이며 균분리 동정배양은 비교적 소수의 균도 분리가능하고 균종동정도 가능하지만 검사과정이 복잡하고 배양에 소요되는 시간도 5~8주정도 걸린다는 단점¹⁾이 있다. 하지만 조직학적 진단방법을 포함한 기존의 진단방법으로는 결핵성 늑막염환자 중 70%정도에서만 진단이 가능¹⁾해서 보다 민감하고 특이도가 높으면서 신속하게 결과를 얻을 수 있는 연구가 계속되어 왔다.

근래에는 Mullis 등^{5,6)}에 의해 DNA중합효소를 이용한 primer directed DNA amplification 기법으로 특정한 DNA를 연속적으로 복제할 수 있는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함)이 개발되어 분자생물학의 여러 분야에서 이용되고 있으며 특히 검체내에 극미량으로 존재하는 병원체의 진단에 매우 유용하게 사용할 수 있게 되었다.

M. tuberculosis 항원들도 유전자가 클론화되고 그 염기서열이 밝혀져 중합효소연쇄반응을 이용해서 결핵균에 특이한 DNA를 선택적으로 증폭함으로써 검체물내 결핵균을 증명할려는 시도가 Hance^{7), Brisson-Noel^{8), Eisenach 등^{9,10)}에 의해서 행해져서 비교적 짧은 시간에 결핵균에 특이한 DNA를 높은}}

민감도를 가지면서 증폭할 수 있다는 사실이 알려져서 결핵 진단의 새로운 보조수단의 하나로 밝은 전망을 보여주고 있다.

하지만, 대부분의 연구가 객담내 결핵균 검출의 민감도, 특이도, 검체물의 DNA분리방법 비교에 관한 것^{10~14)}이고 우리나라에서 삼출성늑막질환의 높은 비도를 차지하는 결핵성늑막염환자에 관한 조사^{15, 16)}는 드문 상태이다. 저자들은 미생물학적, 조직학적으로 진단되거나 임상적으로 추정되는 결핵성 늑막염 환자의 늑막액과 늑막생검조직에서 M. tuberculosis 와 M. bovis에 특이성을 가지며 한 개체내 10~16번 반복 존재한다고 알려진 insertion sequence인 IS6110^{10, 11)}을 목표로하는 primer를 이용한 PCR을 시행해서 그 민감도와 특이도를 조사함으로써 결핵성 늑막염에서 중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균 DNA 검출의 진단적 가치와 의의를 검토하고자 했다.

재료 및 방법

1. 가검물

계명대학교 동산의료원 내과 외래 및 입원환자 중 결핵으로 의심되는 환자로부터 채취한 pleural fluid 21례 및 pleural biopsy tissue 15례를 실험에 사용하였다.

2. 공시균주 및 DNA의 분리

한국 결핵연구원으로부터 분양받은 Mycobacterium tuberculosis H37Rv를 양성대조군으로 사용하였다. 균을 Sauton배지에 2~4주간 배양한 후, bead-beater용 튜브에 균액을 넣고 원심하여 침사를 얻은 후, Tris-EDTA-NaCl(TEN) buffer와 Tris saturated phenol과 chloroform-isoamyl alcohol과

* 이 논문은 1993년도 계명대학교 올종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음

zirconium bead(0.1mm 크기)를 넣은 후 bead-beater로 2분간 진탕시켰다. 이것을 12,000rpm에서 10분간 원심후 상층액을 microfuge tube로 끓긴후 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 섞은 후 원심하여 상층액을 새 투브로 끓겼다. 여기에 3M sodium acetate(pH 5.6)과 cold absolute ethanol을 넣고 -20°C에 20분 방치후, 끌을 굽힌 pasteur pipet으로 DNA를 건져서 cold 70% ethanol이 들어있는 투브에 넣고 섞은후 원심으로 상층액을 제거하였다. Speedvac건조기로 침사를 건조시킨후 소량의 증류수에 녹이고 UV spectrophotometer로 DNA의 순도측정 및 정량을 실시한후 PCR에 사용하였다.

3. Pleural biopsy에서의 DNA분리

Biopsy tissue를 잘게 썰어서 bead-beater용 투브에 넣고 TEN Tris saturated phenol, chloroform-isoamyl alcohol, zirconium bead(0.5mm 크기)를 넣은 후 bead-beater로 10분간 진탕시켰다. 이것을 12,000rpm에서 10분간 원심후 상층액을 microfuge tube로 끓긴후 3M sodium acetate(pH 5.6)과 cold absolute ethanol을 넣고 -20°C에 20분 방치후, 원심하고 상층액을 제거한 후, cold 70% ethanol이 들어있는 투브에 넣고 섞은후 원심하여 상층액을 제거하였다. Speedvac건조기로 침사를 건조시킨후 20-30μl의 증류수에 녹여서 PCR에 사용하였다.

4. Pleural fluid에서의 DNA분리

Pleural fluid 2ml를 bead-beater용 투브에 넣고 12,000rpm으로 10분간 원심하고 상층액을 제거한후, TEN buffer, Tris saturated phenol, chloroform-isoamyl alcohol, zirconium bead(0.1mm 크기)를 넣은 bead-beater로 2분간 진탕시켰다. 이것을 12,000rpm에서 10분간 원심후 상층액을 microfuge tube로 끓긴후 3M sodium acetate(pH 5.6)과 cold absolute ethanol을 넣고 -20°C에 20분 방치후, 원심하고 상층액을 제거한 후, cold 70% ethanol이 들어있는 투브에 넣고 섞은후 원심하여 상층액을 제거하였다. Speedvac건조기로 침사를 건조시킨후 20-30μl의 증류수에 녹여서 PCR에 사용하였다.

5. Oligonucleotide primers

M. tuberculosis IS6110 DNA질편에 특이하게 결합하는 20mer의 sense primer와 20mer의 antisense

primer를 PCR에 사용하였으며, PCR된 DNA산물은 123 bp였고 각 primer의 염기서열은 다음과 같다.

Sense primer:

5'-CCTGCGAGCGTAGGCCGTCGG-3'

Anti-sense primer:

5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'

6. DNA시료의 전처치

M. tuberculosis H37Rv DNA는 95°C에서 5분간 가열후 얼음에 5분간 세운후 PCR에 사용하였다. 예민도 검사를 위해서는 M. tuberculosis H37Rv DNA를 100ng / 5μl에서부터 1fg / 5μl까지 10배씩 계단회석하여 PCR에 사용하였다. 특이도 검사를 위한 각종 DNA들은 다음과 같이 처리하여 PCR를 사용하였다. 즉, pBR322 DNA는 Birnboim 및 Doly 법으로 plasmid DNA를 분리하고 제한효소 BamHI으로 절단후 PCR에 사용하였고, 세포배양된 Herpse simplex 바이러스액 및 Varicella-Zoster 바이러스액은 0.5ml microtube에 넣고 90°C에서 10분간 가열한 후 얼음에 3분간 세웠다가 미량고속원심기로 3분간 원심하고 상층액을 새 microtube로 끓긴후 PCR에 사용하였다. B 형간염 바이러스 cDNA는 Birnboim 및 Doly법으로 cloned plasmid DNA를 분리하고 제한효소 BamHI으로 절단후 agarose gel에서 전기영동하여 나타난 3.2Kb band의 gel부위를 잘라내고, [Gene clean 키트] (BIO 101, La Jolla, U. S. A.)를 사용하여 cDNA를 분리한 후 PCR에 사용하였다. λ 박테리오파지 DNA는 Perkin Elmer Cetus사(U. S. A.)의 상품을 PCR에 사용하였다. 인간 정상혈액 DNA는 정상인 혈액 10ml를 채혈후 Kunkel 등의 방법에 의해 genomic DNA를 분리한 후 PCR에 사용하였다.

7. PCR 조건

먼저 DNA시료를 94°C에서 60초간 예열하여 DNA를 변성시킨 후, 다음과 같은 조건으로 30회 PCR을 시행하였다. PCR의 총량은 50μl로 하였고, 0.5ml microtube(Sarstedt, Germany)를 사용하였다. 50mM KCl, 10mM Tris HCl(pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.01%(wt / v) gelatin이 함유된 reaction mixture(Perkin Elmer Cetus, U. S. A.)를 사용하였고, 각각 200μM의 dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Perkin Elmer Cetus, U. S. A.)와 2.5unit의 Taq

DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus제 및 KIST 유전공학연구소 생산품)를 사용하였다. Primer들은 각각 1μM씩 사용하였으며 최종적으로 30μl의 mineral oil(Perkin Elmer Cetus제)로 덮은 후 PCR을 실시하였다. DNA denaturation은 94°C에서 60초, primer annealing은 60°C에서 120초, DNA extension은 72°C에서 180초간 실시하였고 마지막(30 cycle) 단계의 extension시간은 600초간 실시하였다. PCR에 사용한 장비는 미국 Ericomp사의 Easy Cycler(수냉식)를 이용하였다. 매 실험마다 *M. tuberculosis* H37Rv DNA를 양성대조군으로 사용하였고, DNA시료를 제외한 모든 것이 함유된 것을 음성대조군으로 사용하였다.

8. 전기영동에 의한 PCR산물의 검색

PCR산물 10μl를 취하여 2μl의 gel loading buffer(Type I)와 섞은 후 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel 혹은 4% NuSieve 3 : 1 agarose(FMC Co., U.S.A.)에 접종후 1X Tris-Acetate-EDTA(TAE) buffer로 minigel 영동기에서 50 Volt로 40분간 수평형 잠수식 전기영동을 실시한 후, UV transilluminator(302nm 파장)와 Polaroid camera를 이용하여 사진촬영한 후 123bp 크기의 DNA band 유무를 보아 확인하였다. 이때 DNA size marker로는 123 DNA ladder(BRL, U.S.A.)를 사용하였다.

9. Southern blot에 의한 PCR산물의 검색

전기영동후 사진촬영이 끝난 gel을 1.5M NaCl-0.5N NaOH용액(denaturation solution)에 담그고 실온에서 20분 진탕후 1.5M NaCl-1M Tris-HCl용액(neutralization solution)에 담그고 실온에서 20분 진탕하였다. 그후 gel상의 DNA를 20X SSC(sodium chloride-sodium citrate)액을 이용하여 nitrocellulose(NC) filter(0.2μm pore size, Schleicher & Schuell, Germany)에 실온에서 약 4시간 blotting 시킨 후 진공 오븐에서 80°C로 90분간 가열하여 고정시킨 후 비닐봉투에 넣어 밀봉하여 진공데시케이터에 보관하다가 hybridization을 실시하였다.

10. Digoxigenin-probe를 사용한 hybridization 및 발색

M. tuberculosis IS6110 DNA 절편을 random primed DNA labeling법에 의해 digoxigenin-11-dUTP로 labeling시킨 DNA를 probe로 사용하였다.

5X SSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS가 함유된 prehybridization solution을 넣고 68°C에서 2시간 prehybridization을 실시하였다. *M. tuberculosis* IS6110 DNA probe를 95°C에 10분간 가열하여 denaturation시키고, 얼음에 5분간 세운 후 hybridization solution과 섞어서 NC filter에 넣고 68°C에서 15시간 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 끝난 NC filter를 2X SSC, 0.1% SDS액으로 실온에서 5분간 2회 세척한 후 0.1X SSC, 0.1% SDS액으로 68°C에서 15분간 2회 세척하였다. NC filter를 100mM Tris-HCl, 150mM NaCl(pH 7.5)액으로 실온에서 1분간 씻은 후 blocking buffer에 30분간 부린 후 alkaline-phosphatase가 결합된 항-digoxigenin-항체액에 30분간 부린시켰다. NC filter를 NBT와 X-phosphate가 함유된 발색액에 담구고 1~2시간 부린 하여 발색시키고 TE액을 넣어 발색을 정지시킨 후 사진촬영하여 판독하였다.

성 적

결핵균 IS6110 DNA를 대상으로 하는 본 PCR 검사의 예민도를 조사하기 위해, *M. tuberculosis* H37Rv 균주의 DNA를 분리하여 100ng/5μl에서부터 1fg/5μl까지 10배씩 계단화식하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기 영동상에서는 10fg/5μl까지 검출가능하였으며, Southern blot 상에서도 동일하였다(Fig 1). 본 PCR검사의 특이도를 조사하기 위해 pBR322 DNA와 단순포진바이러스(HSV), 수두-대상포진 바이러스(VZV), B형간염 바이러스(HBV), cDNA, lambda 박테리오파지 DNA 및 정상인 혈액 DNA 등을 대상으로 PCR을 실시하였다. 그 결과 agarose gel 전기영동상에서나 Southern blot 상 모두에서 결핵균 DNA만이 123bp의 target DNA band가 검출되었으며, plasmid pBR322, HSV, VZV, HBV, cDNA, 박테리오파지 DNA, 정상혈액 DNA 등은 모두 PCR 검사 음성으로 나타났다(Fig 2). 15례의 pleural biopsy tissue를 대상으로 하여 bead-beating 방법으로 DNA를 분리후 PCR을 실시한 결과 13례(86.6%)가 결핵균 DNA 양성이었다. Biopsy tissue의 병리조직학적 진단성적과 PCR성적을 비교하면 [granulomatous inflammation] 10례 중 10례 모두가 PCR양성이었고, [tuberculosis] 2례도 모두가 PCR양성이었으며, [chronic inflammation] 1례는 PCR음성이었고,

[non-made] 1례는 PCR양성이었으며, [inadequate specimen] 1례는 PCR음성이었다(Fig 3 및 Table 1). 21례의 pleural fluid를 대상으로 하여 bead-beating방법으로 DNA를 분리후 PCR을 실시한 결

과 17례(80.9%)가 결핵균 DNA양성이었다(Fig 4). 그리고 pleural biopsy와 pleural fluid를 같이 검사한 15례중 13례(86.6%)가 PCR양성이었다(Table 2).

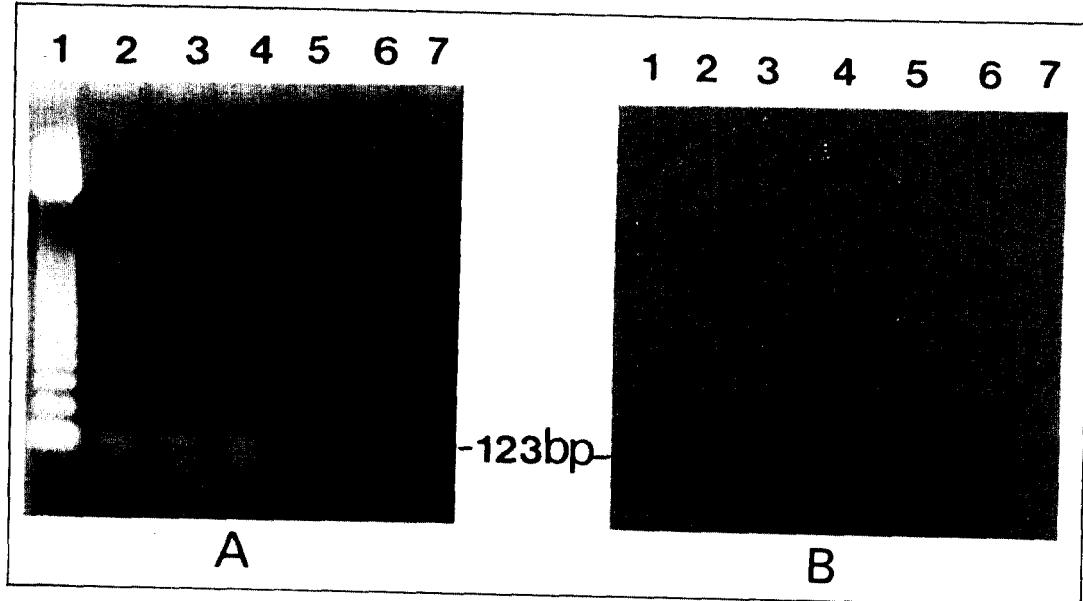


Fig. 1. Sensitivity of PCR detection of *M. tuberculosis* IS6110 DNA. A) Separation on agarose gel of PCR products. Lane 1: DNA size marker(123 ladder), lane 2 to 7: 123 bp PCR products of various concentrations of DNA from *M. tuberculosis* H37Rv(lane 2: 100ng/5μl, lane 3: 10ng/5μl, lane 4: 1ng/5μl, lane 5: 100fg/5μl, lane 6: 10fg/5μl lane 7: 1fg/5μl). B) Southern blotting results of A(Digoxigenin-labeled *M. tuberculosis* IS6110 DNA probe and nitrocellulose filters were used).

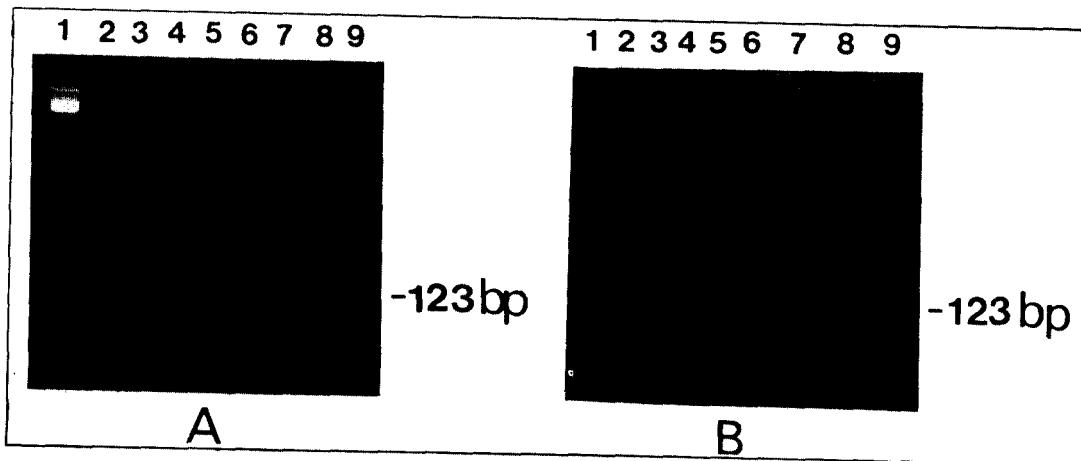


Fig. 2. Specificity of PCR detection of *M. tuberculosis* IS6110 DNA. A) Separation on agarose gel of PCR products. Lane 1: DNA size marker(123 ladder), lane 2: PCR of plasmid pBR322 DNA, lane 3: PCR of Herpes Simplex virus infected cells, lane 4: PCR of Varicella-Zoster virus infected cells, lane 5: PCR of cloned Hepatitis B virus DNA, lane 6: PCR of λ bacteriophage DNA, lane 7: PCR of human normal blood DNA, lane 8: negative control, lane 9: 123 bp PCR product from *M. tuberculosis* H37Rv. B) Southern blotting results of a(Digoxigenin-labeled *M. tuberculosis* IS6110 DNA probe and nitrocellulose filters were used).

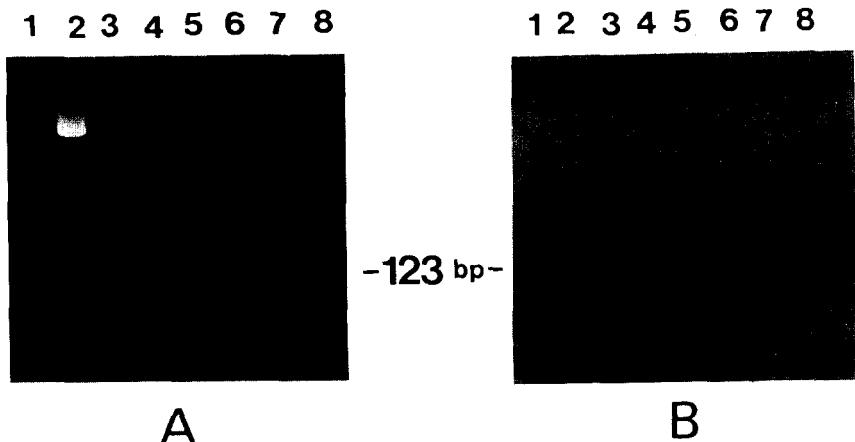


Fig. 3. PCR detection of *M. tuberculosis* IS6110 DNA in pleural biopsy specimens from patients suspected as tuberculosis. A) Separation on agarose gel of PCR products. Lanes 1: negative control, lane 2: DNA size marker(123 ladder), lane 3: positive control, lane 4 to 8: 123 bp PCR products from pleural biopsy specimens. B) Southern blotting results of A(Digoxigenin-labeled *M. tuberculosis* IS6110 DNA probe and nitrocellulose filters were used).

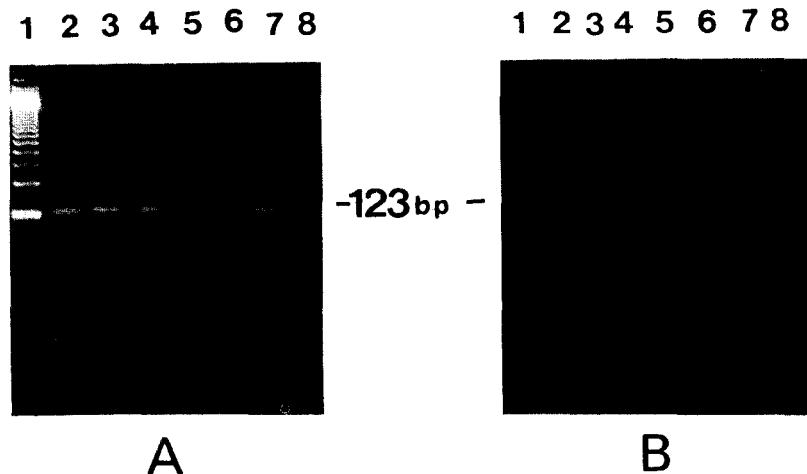


Fig. 4. PCR detection of *M. tuberculosis* IS6110 DNA in pleural-fluid specimens from patients suspected as tuberculosis. A) Separation on agarose gel of PCR products. Lane 1: DNA size marker(123 ladder), lane 2 to 6: 123 bp PCR products from pleural fluid specimens, lane 7: positive control, lane 8: negative control. B) Southern blotting results of A(Digoxigenin-labeled *M. tuberculosis* IS6110 DNA probe and nitrocellulose filters were used).

Table 1. Comparison of M. tuberculosis IS6110 DNA PCR Results in Patients with Various Pathologic Biopsy Diagnosis

Pathologic Diagnosis	No. of Specimens	No.(%) of Positive PCR Results
Granulomatous inflammation	10	10(100)
Tuberculosis	2	2(100)
Chronic inflammation	1	0(0)
Non-nodular	1	1(100)
Inadequate specimen	1	0(0)
Total	15	13(86.6)

Table 2. Frequency of Detection of M. tuberculosis IS6110 DNA in Pleural Biopsy Tissues and Pleural Fluids by PCR

Clinical Specimen	No. of Specimen	No.(%) of Positive PCR Results
Pleural Biopsy	15	13(86.6)
Pleural Fluid	21	17(80.9)
Biopsy+Fluid	15	13(86.6)

고 칠

중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균 핵산의 검출은 1989년 Hance 등⁷⁾과 Brisson-Noel 등⁸⁾에 의해서 결핵균 65KD 항원 유전자의 일부인 383bp를 증폭하는 결핵균에 특이성을 갖는 primer를 발견함으로써 시작되었다. 이후 Patel 등¹⁷⁾이 pMTb4에서 만든 primer로써 Pao 등¹⁸⁾은 65KD 항원 유전자 일부인 165bp 분절, Sjobring 등¹⁹⁾은 38KD 항원 일부인 419bp 분절, Wit 등¹⁹⁾은 336bp 분절, Shanker 등²⁰⁾은 38KD 항원 중 240bp 분절, Eisenach 등⁹⁾이 결핵균에 특이한 분절인 IS6110 중 123bp 분절을 증폭하는 등 현재에는 결핵균에 특이성을 가지는 10여종이상의 Primer가 발견되었다.

각 연구자들의 연구 결과는 일반적으로 결핵균 검출에 높은 예민도를 보이나 특이도는 서로 차이를 보여서 높은 예민도에 대해서는 일치된 결과를 보이나 특이도에 대해서는 primer에 따른 차이가 있음을 알 수 있다. 현재까지 결핵균 검출에 어떠한 primer를 사용해야 좋을 지에 대해서는 명확한 결론이 내려져 있지 않지만 결핵균 한개체내에 10~16번 반복 존재하기 때문에 검체내 소량 존재하여도 이론적으로 검출될 가능성이 많고 목표 DNA 분절이 123bp여서 핵산 분리시 손상 가능성이 적으며 결핵균에 특이한 IS6110 분절 중 123bp를 목표로 하는 primer를 이

용한 PCR^{9, 10)}이 다른 primer를 사용한 방법보다 우수한 결과를 얻을 수 있다는 보고^{21, 22)}가 있어서 현재 가장 널리 사용되고 있으며 저자등도 IS6110 중 123bp를 목표로 하는 Primer를 이용해서 실험하였다. 결핵균을 검출하는 PCR의 민감도는 Eisenach 등^{9, 10)}은 결핵균 DNA 1fg까지 보고하였고 조상래 등은 0.5fg¹¹⁾까지 보고하여서 이는 이론상 결핵균 1개에 해당하는 것이다. 본 연구에서는 10fg / 5μl 까지 검출할 수 있었으며 이는 검체물, 1ml당 결핵균 5마리에 해당하는 것이라서 도말이나 배양보다는 훨씬 높은 예민도를 가진 것을 확인할 수 있었다. IS6110을 목표로 하는 PCR은 M. tuberculosis, M. bovis, M. simiae DNA만이 반응한다고 알려져 있고^{9, 10)} M. simiae의 경우 사람에게 감염 가능성이 거의 없기 때문에 다른 비정형결핵균에 대한 PCR의 특이도 검사는 시행하지 않았다. 검체물로부터 결핵균 DNA를 증폭하는 과정에서 비특이적인 DNA의 증폭이 예상되기 때문에 즉 123bp이외의 서로 다른 크기의 DNA band들이 dimer를 이루어 증폭되거나 primer와 유사한 구조의 다른 부위의 DNA에서 비특이적으로 증폭이 일어날 수 있기 때문에 검출된 PCR 산물을의 검정이 필요하며 본 연구에서는 digoxigenin probe를 이용한 southern blot법으로 PCR 산물을 검정하였다. 이러한 비특이적 결합은 annealing 온도를 올려주면 해결되나 이러한 경우에는 원래 나와야 할 band도 나오지 않아서 검사의 예민도를 저하시키기

때문에 적절한 annealing 온도의 결정이 필요하다.

이와같이 PCR은 높은 예민도와 특이도를 가지면서 신속히 검체물내에서 결핵균을 검출할 수 있는 반면에 그 높은 민감도 때문에 위양성반응과 carry over contamination이 항상 문제가 된다. 오염을 최소화하고 위양성반응을 줄이기 위해서 Kwok 등²³⁾은 DNA 추출실험과 PCR mixture제조실험, PCR 시행 및 결과 분석하는 실험실을 분리할 것, 장비와 공급불도 분리하면서 고유의 목적에 전용해야 할 것, 사용시약을 항상 멸균하면서 일회용 기구를 사용하고 글로브의 사용을 상용화 할 것, 뷔김에 의한 뚜껑의 오염을 막기위해서 자주 원심분리를 시행할 것, 사용시약을 미리 섞어 놓을 것, 조작에 의한 오염을 줄이기 위해서 template는 될 수 있는대로 마지막에 첨가하고 양성, 음성 대조군을 지속해서 사용하는 것을 추천하고 있다. 이외 화학적 방법으로 8-methoxypсорalen(8-MOP) 처리후 자외선 조사로 오염된 DNA가 주형 DNA로 역할할 수 없게 하거나²⁴⁾ dUTP로 합성된 PCR산물인 uracil DNA를 UNG로 분해하는 방법²⁵⁾ 등이 있다.

세포벽의 불투과성 때문에 결핵균에서 DNA를 분리하는 것은 대단히 어려웠으나 Patel 등²⁶⁾이 유기 용제를 이용해서 세포벽의 지질성분을 제거한 후 단백분해효소등을 세포벽을 통해 침투시킬 수 있게 되어 결핵균의 DNA를 손상받지 않고 DNA를 분리할 수 있게 되었다. 하지만 DNA분리시 사용하는 sodium dodecyl sulfate(SDS), phenol이나 검체내 hemoglobin²⁷⁾, 분리된 DNA내 남아있는 다양한의 당류나 단백질²⁸⁾ 등이 taq polymerase의 활성도를 약화시키는 억제인자로 작용하는 것이 PCR의 또 다른 문제점이다. 이를 해결하기 위해서 DNA추출물을 회석하는 것은 주형 DNA도 회석되기 때문에 바람직한 방법이 아니다¹³⁾. Cetyltrimethyl ammonium bromide(CTAB) 처리²⁹⁾가 taq중합효소억제인자를 제거할 수 있다는 보고도 있고 이외에 본연구와 같이 유기용체를 사용하지 않고 bead-beating법 즉 물리적방법으로 DNA를 분리하는 방법도 방해요소를 최소화하기 위한 한 방법이다.

Pierre 등³⁰⁾은 nested primer로 재증폭시켜서 특이도에 영향을 미치지 않고 예민도를 높일 수 있다고 보고해서 검사의 예민도를 높이는 방법으로 이용되고 있다. 한가지 흥미로운 사실은 Lassence 등²²⁾이 늑막액내 호중구비율이 상대적으로 높은 군에서 결핵균에 대한 PCR 양성을 높았다는 보고이다.

결핵성 늑막염환자의 늑막액에 제일 초기에 보이는 염증세포인 호중구가³¹⁾가 결핵균을 탐식하고 있다면 늑막액에서 호중구를 분리해서 결핵균 DNA에 대한 PCR을 실시하는 것도 검사의 민감도를 높이는 방법일 것이다.

결핵성 늑막염 환자의 늑막생검 조직 15례중 2례 늑막액 21례중 4례에서 PCR음성이었는데 이러한 환자군에서는 늑막삼출의 원인이 결핵균 단백질에 대한 과민성에 의한 것¹¹⁾일 수도 있을 것이다. 본 연구는 결핵성 늑막염이 확진되거나 임상적으로 추정되는 환자만을 대상으로 했으나 일반 임상검체를 대상으로 PCR을 실시했을 때 5~10%^{22, 27)}에서 나타난다고 알려진 오염 요인(의의 위양성에 대한 해석과 사균과 생균의 감별에 대한 연구도 뒤따라야겠다.

하지만 이런 여러 문제점에도 불구하고 고령의 환자에서 늑막삼출의 원인이 악성종양에 기인한 것인지 결핵에 의한 것인지 감별이 되지 않을 때는 유용한 보조수단으로 사용될 수 있으리라 사료되며 보다 많은 환자를 대상으로 한 전향적 연구가 이루어지면 결핵성 늑막염 진단에 PCR 이용의 의의에 대한 평가를 내릴 수 있으리라 사료된다.

요 약

미생물학적, 조직학적으로 진단되거나 임상적으로 추정되는 결핵성 늑막염환자의 늑막액과 늑막생검 조직에서 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*에 특이성을 가지는 insertion sequence인 IS6110을 목표로 하는 primer를 이용해서 PCR을 실시했다. 결핵균 DNA를 분리하여 계단 회석해서 PCR을 실시한 결과 10fg / 5μl까지 검출할 수 있었고 plasmid PBR322, HSV, VZV, HBV, cDNA, 박테리오파지 DNA, 정상 혈액 DNA 등은 모두 PCR 검사음성이고 결핵균 DNA만이 123bp의 target DNA band가 검출되었으며 southern blot상에서도 동일하였다.

15례의 늑막생검 조직 중 13례(86.6%)가 결핵균 DNA 양성이었다. 병리학적 진단성적과 PCR 성적을 비교하면 granulomatous inflammation 10례 중 10례 tuberculosis 2례 중 2례 모두 양성이었고 chronic inflammation 1례는 음성, non-made 1례는 PCR 양성, inadequate specimen 1례는 음성이었다. 21례의 늑막액 중 17례(80.9%)에서 결핵균 DNA 양성이었고 이중 늑막생검조직과 늑막액을 같이 검사한 15례 중 13례(86.6%)가 PCR 양성이었다.

따라서 늑막생검 조직뿐 아니라 늑막액에서 결핵균 DNA에 대한 중합효소연쇄반응(PCR)은 결핵성 늑막염의 진단에 높은 민감도와 특이도를 가지는 검사방법으로 생각되어며 결핵성 늑막염 진단에 유용한 보조수단으로 이용될 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Berger HW, Mejia E: Tuberculous pleurisy. Chest 1973; 63: 88-92
2. Falk A: Tuberculous pleurisy with effusion: diagnosis and results of chemotherapy. Post-grad Med 1965; 38: 631-5
3. Levine H, Metzger W, Lacera D, et al: Diagnosis of tuberculous pleurisy by culture of pleural biopsy specimen. Arch Intern Med 1970; 126: 269-71
4. Bates JH: Diagnosis of tuberculosis. Chest 1979; 76: 759-763
5. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230: 1350-1354
6. Saiki RK, Glenfand DH, Stoffel S, et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermo-stable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-491
7. Hance AJ, Grandchamp B, Lavy-frebault V, et al: Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol 1989; 3: 843-849
8. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, et al: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; 11: 1069-1071
9. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, et al: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for mycobacterium tuberculosis. J. Infect. Dis 1990; 161: 977-981
10. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, et al: Detection of mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Resp Dis 1991; 144: 1160-1163
11. 조상래, 이태윤, 윤경한 외: 중합효소연쇄반응을 이용한 가검물내 *Mycobacterium tuberculosis* 의 검출. 대한미생물학회지 1990; 25: 491-499
12. 윤경한: PCR을 위한 결핵균 DNA 분리 방법의 비교. 대한미생물학회지 1991; 26: 160-166
13. 김상재, 박영길, 조상현 외: 혈산중합효소연쇄반응에 의한 병리검체내 결핵균의 검출 I, primers 선택과 반응조건. 대한미생물학회지 1992; 27: 35-44
14. 신완식: 결핵진단의 면역학적 및 분자생물학적 방법. 결핵 및 호흡기질환 1992; 39: 1-6
15. 김호중, 김영환, 한성구 외: 흥막삼출액에서 polymerase chain reaction을 이용한 결핵균의 검출에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환. 1993; 40: 509-518
16. Pao CC, Benedict Yen TS, You JB, et al: Detection and identification of *mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol 1990; 28: 1877-1880
17. Patel RJ, Fries JW, Piessens WF, et al: Sequence analysis and identification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1990; 28: 513-518
18. Sjobring ULF, Mecklenburg M, Andersen AB, et al: Polymerase chain reaction for detection of *mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1990; 28: 2200-2204
19. Wit DD, Steyn L, Schoemaker S, et al: Direct detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. J Clin Microbial 1990; 28: 2437-2441
20. Shanker P, Manjunach N, Monan KK, et al: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Lancet 1991; 337: 5-7
21. Walker DA, Taylor IK, Mitchell DM, et al: Comparison of polymerase chain reaction amplification of two mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 65KDa antigen gene in the diagnosis of tuberculosis. Thorax 1992; 47: 690

22. Lassence AD, Lecossier D, Pierre C, et al: Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction: comparison of two protocols. *Thorax* 1992; 47: 265-269
23. Kwok S, Higuchi RD: Avoiding false positive with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238
24. Jinno Y, Yoshiura K, Niikawa N: Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR. *Nuc Acid Res* 1990; 18: 6739
25. Gene Amp PCR carry over prevention kit, perkin elmer cetus, 761, Main Ave, Norwalk, G 06859, USA
26. Patel R, Kvach JT, Mounts P: Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 541-551
27. Brisson-Noel A, Aznar C, Chureau C, et al: Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; 338: 364
28. Fidler H, Rook Gaw, Johnson NM, et al: Search of mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 777
29. Pontius BW, Berg P: Rapid renaturation of complementary DNA strands mediated by cationic detergents: a role for high probability binding domains in enhancing the kinetics of molecular assembly processes. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 8237-8241
30. Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, et al: Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples by amplication of DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 712-717
31. Antony VB, Repine JE, Harada RN, et al: Inflammatory responses in experimental tuberculous pleurisy. *Acta Cytol* 1983; 27: 355-361

=Abstract=

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pleural biopsy tissues and pleural fluids by Polymerase Chain Reaction(PCR)*

Seung Beom Han, MD; Jeong Sook Hue, MD; Young June Jeon, MD
Seong Duk Paik^{o**}, Won Ki Baek^o, MD^{**}; and Min Ho Suh^o MD^{**}

*Departments of Internal Medicine and Microbiology**

Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Polymerase Chain Reaction(PCR) amplification was used to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pleural biopsy tissues and pleural fluids from patients suspected as tuberculosis. Oligonucleotide pairs for *M. tuberculosis* IS6110 DNA were used as primers and *M. tuberculosis* H37Rv strain was used as a positive control. Amplified products of 123 base pair fragments were detected by agarose gel electrophoresis and by Southern blotting with digoxigenin-labeled *M. tuberculosis* IS6110 DNA probe. DNA were isolated directly from the clinical specimens by bead-beating technic.

Positive results were obtained in 13 of 15(86.6%) pleural biopsy tissues and 17 of 21(80.9%) pleural fluids. All the positive results were positive both in agarose gels and in Southern blottings. The relationships between the biopsy findings and PCR results were evaluated. Two 「tuberculosis」, 10 「granulomatous inflammations」, and one 「non-made」 findings of biopsy results were all positive by PCR. But one 「chronic inflammation」 and one 「inadequate specimen」 findings of biopsy results were all negative by PCR.

In conclusion, these results showed that the PCR provides a very sensitive and efficient tool for the accurate and rapid diagnosis of tuberculosis infection.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, PCR, Pleural biopsy, Pleural fluid