

## 심상성 루프스에서 Nested-Primer Gene Amplification Assay에 의한 결핵균 DNA의 검출

계명대학교 의과대학 피부과학교실 및 임상병리학교실\*

신문석 · 권호준 · 김병천 · 이규석 · 송준영 · 전효진\* · 김재룡\*

피부결핵은 드문 질환으로 피부과 외래 환자의 0.1~2.2%를 차지하는데 그중에서는 심상성 루프스가 가장 흔한 형태이다<sup>1)</sup>.

심상성루프스는 결핵균의 재감염으로 인한 이차적 피부결핵의 일종으로 중등도 혹은 고도의 면역을 가진 사람에서 발생한다. 임상 양상은 구진, 판, 혹은 궤양으로 흔히 반흔을 남기고 치유되며 주로 안면, 경부 등 노출부에 호발하나 드물게 하지에 발생하기도 한다<sup>2)</sup>.

조직학적 소견은 결핵 결절 혹은 결핵양 구조가 상피양 세포로 구성되어 있으며 결핵 결절내에서 전락성 궤사는 경하게 나타나거나 나타나지 않는다. 거대세포는 주로 핵이 가장자리에 위치한 Langhans 형이지만 불규칙하게 배열되어 있는 foreign body 형도 때때로 관찰된다. 또한 병변부에서 간혹 단핵세포의 침윤이 나타나기도 한다<sup>3)</sup>.

피부 결핵의 확진은 조직이나 배양 검사에서 결핵균을 발견함으로써 이루어 질 수 있으나, 증명에 실패하는 경우 질환의 과거력 및 경과, 특징적인 임상 양상, 조직학적 특징, 항 결핵제에의 반응 여부 및 Mantoux test 등으로 피부 결핵을 추정 진단할 수 있지만 결핵의 확실한 진단을 위해서는 *M. tuberculosis*의 분리가 요구된다<sup>4)</sup>.

항상균을 검출하기 위한 현미경학적 검사는 다소 빠른 방법이지만 특이도나 민감도가 부족하다<sup>5)</sup>. Latex agglutination, radioimmunoassay, enzyme-lined immunosorbent assay와 같이 면역학적인 방법들도 비슷한 제한점을 가지고 있다<sup>6)</sup>.

최근에 다양한 임상 검체에서 각종 감염증을 직접적으로 진단하는데 종합효소 연쇄반응이 사용되어지고 있다<sup>7)</sup>. 종합효소 연쇄반응은 특이적인 DNA 염기 서열을 증폭시킴으로써 특히 *M. tuberculosis*와 *M. leprae* 같은 저상장 병원체를 신속히 확진하는데 유용한 방법으로 인정되고 있다<sup>8,9)</sup>. 종합효소 연쇄반

응은 여러가지 종류의 검체를 사용할 수 있으며 검체로부터 분리한 DNA가 그렇게 순수할 필요가 없다는 점이 다른 분자 생물학적 진단법에 비해 강점이 될 수 있으며 이러한 이유로 인해 많은 수의 검체를 동시에 처리해야하는 임상에서는 그 진단적 가치가 더욱 크다고 할 수 있다. 또한 파라핀 포매조직을 검체로 사용할 수 있으므로 질환의 후향적 관찰도 가능하다. 종합효소 연쇄반응을 이용한 균검출의 민감도를 높이기 위한 시도로 DNA 추출과 정제<sup>10)</sup>, isotopically labeled probes의 이용<sup>11)</sup>, nested primers<sup>12)</sup>를 사용한 음성인 검체를 재증폭시키는 방법으로 민감도를 증가시키기 위한 방법들에 많은 연구가 시도되고 있다. Pirre 등<sup>12)</sup>은 radioactive hybridization으로 재증폭을 이용해서 특이도에 영향을 주지 않으면서 민감도를 60~100%로 증가시켰다고 보고하고 있다. 최근에 이중 종합효소연쇄반응(Nested-PCR)은 방사성 동위원소를 사용하지 않는 안전한 검사법으로 임상에서 쉽게 나병의 진단에 이용되는 빈도가 증가하고 있다. 또한 이 방법은 증폭하려는 유전자 부분을 먼저 outside primers로 증폭시키고 여기서 얻어진 반응 산물의 염기서열중 일부분을 목표로 하는 inside primers와 반응시켜 2번째 증폭을 시행하여 적은 수의 DNA도 효과적으로 증폭시킬 수 있다<sup>13)</sup>.

현정과 전동석<sup>14)</sup>은 임상적으로 결핵이 의심되나 항산성 염색법 음성인 경우가 많은 결핵성 뇌막염, 결핵성 늑막염, 결핵성 복막염 및 신결핵 등의 폐외 결핵의 진단을 위한 종합효소 연쇄반응의 표준 지침을 수립한 목적으로 결핵을 의심하여 세균학적 검사가 의뢰된 가검물중에 항산성 염색법 음성으로 판정된 70례중 종합 효소 연쇄 반응 양성을 보인 경우는 33.8% 보고하고 있으며 가장 예민도가 높은 종합효소 연쇄 반응의 방법인 nested-PCR법이 항산성 염색법 음성인 검체에서의 결핵 진단을 위한 종합 효

소 연쇄 반응법으로서 가치가 있는 것으로 보고하고 있으며, single-step PCR보다 two-step nested PCR 법이 민감도가 상당히 높은 것으로 보고하였으며 single step-PCR법과 비교해 볼때, two-step PCR 은 마테리아 숫자나 DNA 양에서 비교시 거의 1000 배의 민감도를 증진시킬 수 있다고! 보고하고 있다. 이 방법은 이미 human T-cell leukemia virus type I<sup>[10]</sup> 혹은 혈액내에서 간염 B 바이러스<sup>[11]</sup> 그리고 객담 및 위 세척물<sup>[12]</sup>에서 *M. tuberculosis*를 검출할 수 있다고 보고되고 있다. 결핵균의 검출을 위한 전통적인 방법과 비교해 볼때, nested PCR 이 민감도와 신

속성에서 월등히 높으며 전통적인 방법이 음성인 결과가 나올 지라도 nested PCR 법이 양성이면 양성으로 판정할 수 있는 특이도가 높은 방법이다. 이 연구에서도 임상 및 병리 조직 검사 소견으로 심상성 루프스로 생각하고 결핵균을 검출하기 위해 two-step nested primer 종합효소 연쇄 반응을 실시한 결과 188 bp DNA band를 확인하여, 피부결핵으로 확진하고 isoniazid, rifampin 및 ethambutol의 삼중화학요법을 시행한바 치료 5개월후 병변의 임상적인 호전을 보여 현재 경과를 관찰중에 있다.



Fig. 1. Localized well defined verrucous surfaced dull-red color erythematous plaques on the both buttock area.



Fig. 2. Tuberculous granuloma consist mainly of epithelioid cells and mononuclear cells in periphery (H & E stain X 100).

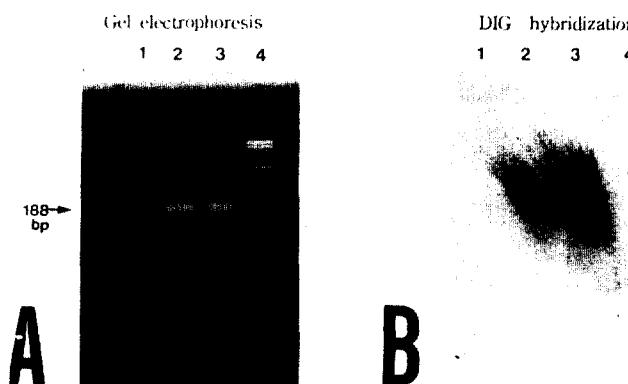


Fig. 3. PCR detection of *M. tuberculosis* DNA in tissue from patient

- A : Agarose gel analysis of PCR products  
B : Southern blot analysis of Digoxigenin-labeled *M. tuberculosis* DNA probe  
Lane 1 : negative control  
Lane 2 : tissue sample from patient  
Lane 3 : positive DNA control purified *M. tuberculosis*  
Lane 4 : size marker(100)

#### 참 고 문 헌

1. 이연복, 조백기, 허위: 최근 5년간 피부결핵의 임상적 조작학적 관찰. 대한피부과학회지 1975; 13: 103-108.
2. Moschella SL, Hurley HJ: *Dermatology*, ed 3. Philadelphia, WB Saunders, 1992, pp 1093-1095.
3. Lever WF, Schaumberg-Lever G: *Histopathology of the skin*, ed 7. Philadelphia JB Lippincott, 1990, pp 328-330.
4. Ulrike S, Neal SP, Craig LL: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a case of lupus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 318-322.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK, et al.: *Manual of clinical microbiology*. Amer Soc Microbiol 1991: 304-339.
6. Danial MT, Debanne SM: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Amer Rev Respir Dis* 1987; 135: 1137-1151.
7. 신동학, 배옥석, 전효진 등: 유전성 질환 및 감염성 질환의 진단을 위한 PCR의 적용. *임상병리와 정도관리*. 1994; 16(1): 193-206.
8. Lee KS, Oh KY, Ryoo YW, et al.: Detection of *Mycobacterium leprae* in Tissue and Blood by Polymerase Chain Reaction. *Int J Leprae* 1994; 62(1): 139-140.
9. De Witt D, Steyn L, Shoemaker S, et al.: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2437-2441.
10. Shankar P, Manjunath N, Lakshmi R, et al.: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction (PCR). *Lancet* 1990; 335: 423.
11. Pao CC, Yen TS, You JB, et al.: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1877-1880.
12. Pirre C, Lecossier Y, Boussougant D, et al.: Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* on clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 712-717.
13. 박건, 원영호, 김영표 등: 이중 증합효소연쇄반응 (Nested-PCR)을 이용한 파라핀 포매조직내의 나垢의 검출. *대한피부과학회지* 1994; 32: 462-468.

14. 현정애, 전동석: 보세관 종합호소 연쇄반응에 의한 결핵균 검출. 계명대학교 대학원 의학과 임상 병리학 전공 박사학위 논문, 1993, pp 1-33.
15. Matsumoto C, Mitsunaga S, Oguchi T, et al.: Detection of human T-cell leukemia virus type I(HTLV-1)provirus in an infected cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method: comparision with HTLV-1 antibody tests. *J Virol* 1990; 64: 5290-5294.
16. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RS: Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1751-1759.

=Abstract=

## Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA in a Case of Lupus Vulgaris Using a Nested-Primer Gene Amplification Assay

Moon Seok Sihn, MD; Ho June Kwon, MD; Byung Chun Kim, MD  
Kyu Suk Lee, MD; Joon Young Song, MD; Hyo Jin Chun, MD;\* Jae Ryong Kim, MD \*

Department of Dermatology, Department of Clinical Pathology\*

Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Lupus vulgaris, which is a progressive form of postprimary tuberculosis in patients with a moderate to high degree of immunity and tuberculin sensitivity, is the most common, most serious, and most variable type of cutaneous and mucous membrane tuberculosis.

Demonstration of *M. tuberculosis* directly or in culture in some of these eruptions can be difficult. It is essential to demonstrate the presence of *M. tuberculosis* in a clinical sample for a definitive diagnosis of tuberculosis.

With the discovery of the polymerase chain reaction (PCR), the DNA diagnostic approach for infection has developed in a short period. With the dual purpose of definitive and rapid diagnosis of tuberculosis, this study examined the usefulness of a nested PCR for detection of *M. tuberculosis*. Compared with a single-step PCR, the two-step PCR was able to enhance sensitivity approximately 1,000-fold on the basis of bacterial counts and DNA quantity.

We concluded that two-step nested PCR appeared to be the most useful PCR protocol for early and sensitive diagnostic method detecting *M. tuberculosis* in acid-fast stain negative specimens.

Key words: Lupus vulgaris, Two-step nested polymerase chain Reaction