

만성 육아종성 염증의 파라핀포매 조직에서 다양한 항산균 검출법의 비교

이현승 · 이형남 · 임소영 · 이연수
이교영 · 최영진

가톨릭대학교 의과대학 병원병리학교실

Comparison of Various Detection Methods of *Mycobacterium* Species in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue with Chronic Granulomatous Inflammation

Hyun Seung Lee · Hyoungnam Lee · Soyoung Im · Yun Su Lee · Kyo Young Lee
Yeong Jin Choi

Department of Hospital Pathology, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background : To determine the most effective method for detecting mycobacteria in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue, we compared the results of Ziehl-Neelsen stain (ZNS) and mycobacterial culture with those of polymerase chain reaction (PCR) and real-time quantitative PCR (RQ-PCR). **Methods :** We analyzed 54 cases diagnosed as chronic granulomatous inflammation. In all cases, ZNS and nested PCR using three different primers, IS6110, Mpb64 and IS6110/Rpo β were done. RQ-PCR with the IS6110/Rpo β primer was done in 51 cases. **Results :** Mycobacteria were identified by ZNS in 15/54 (27.8%) cases. RQ-PCR had the highest sensitivity (80.0%) compared to PCR with IS6110 (73.3%), Mpb64 (60.0%) and IS6110/Rpo β (73.3%). Specificity was higher in all PCR experiments (79.5-82.1%) than in RQ-PCR (69.4%) experiments. The false negative rate was lowest for RQ-PCR (20.0%) than for PCR with IS6110 (26.7%), Mpb64 (40.0%) and IS6110/Rpo β (26.7%). The false positive rate was highest for RQ-PCR (30.6%) compared to PCR with IS6110 (20.5%), Mpb64 (17.9%) and IS6110/Rpo β (20.5%). **Conclusions :** RQ-PCR had the highest sensitivity, and the lowest false negative rate, but it also had a higher false positive rate than PCR for detection of mycobacteria in FFPE tissues.

Key Words : Polymerase chain reaction; Stain; *Mycobacterium*; Granulomatous disease, chronic

접수 : 2009년 10월 19일
제재승인 : 2009년 11월 30일

책임저자 : 최영진
우 137-701 서울시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 서울성모병원 병리과
전화: 02-2258-1616
Fax: 02-2258-1628
E-mail: mdyjchoi@catholic.ac.kr

항산균 감염(mycobacterial infection)은 결핵성(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)과 비결핵성(non-tuberculous mycobacterium, NTM) 감염으로 나뉜다. 결핵은 만성 육아종성 염증을 일으키는 대표적 질환으로 국내 유병률이 높아 최근 대한결핵협회에서 보고한 2008년 통계에 의하면 국내 결핵 신환자율은 100,000명당 70.3명에 달하고 있다. 또한 최근 들어 다양한 면역 억제제의 사용 및 human immunodeficiency virus (HIV) 감염 등에 의하여 비결핵성 감염도 증가하고 있다.¹⁻³

병리조직에서 만성 육아종성 염증의 소견을 보이는 경우, 항산균을 포함한 다양한 원인균을 감별하는 것이 필요하므로 흔히 사용되는 파라핀 포매조직에서 항산균을 검출하고 확인하는 것은 환자의 치료에 있어 매우 중요한 요소라 할 수 있다. 현재 포르말린고정 파라핀포매 병리조직에서 항산균을 검출하기 위한 방법으로는 Ziehl-Neelsen염색, 중합효소 연쇄반응(polymerase

chain reaction, PCR) 및 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time quantitative PCR, RQ-PCR)이 주로 이용되고 있다.

Ziehl-Neelsen염색은 병리조직에서 항산균 감염 여부를 확진하는 방법으로 값이 싸고 간편한 방법이지만, 균을 확인하기 위해서는 많은 시간과 노력을 들여야 한다.^{4,5} 병리 진단에 주로 사용되는 파라핀포매 조직에서의 PCR 또는 RQ-PCR의 유용성에 대해서는 다양한 보고가 있으나, 연구자에 따라 문제점도 제기되고 있다.^{5,6} PCR 방법은 항산균 DNA의 특정 부위를 증폭한 후 측정하므로 빠른 시간 안에 항산균을 검출할 수 있다는 장점이 있고, 일반적으로 민감도 및 특이도가 높다고 알려져 있는데, 이는 각각 83.5-100%, 70-99%로 다양하게 보고되고 있다.^{5,7-11} 또한 RQ-PCR은 실시간으로 항산균 DNA의 증폭을 측정하며, 특정 표지자를 사용하므로 기준 PCR법에 비해 높은 특이도와 민감도를 보인다고 보고되고 있다.¹²⁻¹⁶

항산균에 대한 PCR primer로는 *IS6110*, *Mpb64* 및 *Rpoβ* 부위가 주로 사용되고 있는데, *IS6110*과 *Mpb64* 부위가 결핵균에만 존재하는 반면, *Rpoβ* 부위는 모든 항산균에 존재하므로 이를 통해서 비결핵성 항산균도 확인할 수 있다. 이 중 *IS6110* 유전자 부위는 MTB complex에 속하는 대부분의 균주(*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis bacillus Calmette-Guerin*, *M. africanum*, *M. microti*)에 존재하며 결핵균을 진단할 수 있는 유용한 표적 유전자로,^{4,6} 2마리의 결핵균(10 fg)만 있으면 양성 띠가 나타날 수 있다고 하였다.¹⁷⁻¹⁹ 또한 *Mpb64* 유전자 부위는 MTB complex 중 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*에서 관찰되며, *IS6110*보다 높은 감수성을 가진다고 보고되고 있다.²⁰

본 연구는 항산균에 의한 만성 육아종성 염증을 확진하기 위한 최적의 방법을 알아보기 위하여 만성 육아종성 염증으로 진단된 파라핀포매 조직에서 Ziehl-Neelsen 염색을 시행하고 결핵균 배양 유무를 확인하였으며, 항산균 검출을 위해 MTB-PCR (*IS6110*, *Mpb64*), MTB/NTM PCR (*IS6110/Rpoβ*) 및 MTB/NTM RQ-PCR (*IS6110/Rpoβ*)을 시행하여 결과를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

재료

2005년 3월부터 2008년 3월까지 가톨릭대학교 강남성모병원에서 병리조직 검사상 만성 육아종성 염증으로 진단된 54예를 선별하였다. 증례의 연령은 10대에서 80대까지 다양하게 분포되어 있었고, 부위는 두경부(7예), 기관지 점막(4예), 폐(3예), 림프절(10예), 흉막(4예), 대장(9예), 연부 조직(10예), 기타(7예) 등이었다.

방법

Ziehl-Neelsen 염색에 의한 항산균 확인 및 결핵균 배양 결과 확인 54증례 모두에서 Ziehl-Neelsen 염색을 시행하여 광학 현미경상 배율(×1,000)로 항산균의 유무를 확인하였다. 또한 모든 환자에게서 검사 기록을 확인하여 결핵균 배양 유무를 확인하였으며, 총 24증례에서 결핵균 배양이 시행되었다.

파라핀포매 조직에서 DNA 추출 및 농도 측정

크기가 1.0×1.0 cm 이상의 포르말린고정 파라핀포매 조직에서는 5장 이상, 크기가 작은 경우는 10장 이상을 5-10 μm로 분절한 뒤 사용하였다. DNA추출은 QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하였고, DNA 농도는 Nano drop을 이용하여 측정한 후 사용하였다. 이때 조직에서 추출한 DNA 농도는 증례에 따라 차이가 있었는데, DNA 총량

은 약 2-5 μg이었고, PCR에 사용된 최종 DNA의 양은 100 ng이었다.

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)

추출한 조직 DNA의 적절성 여부를 확인하기 위해 *GAPDH*에 대한 PCR을 병행하여 실시하였다. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 유전자 primer의 염기서열(5' 3')은 forward TTGGTCGTATTGGGCGCCT와 reverse TTC-CATTGATGACAAGCTTC였고, PCR은 95°C에서 3분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초 주기로 35회 시행하고 72°C에서 7분 연장하였다. 이때 증폭 산물의 크기는 272 bp였다.

IS6110 primer를 이용한 MTB PCR

IS6110 primer를 이용한 PCR은 Biocore 키트(Seoul, Korea)를 사용하였으며, 프로토콜에 따라 nested PCR을 시행하였다. 즉 첫 번째 PCR 혼합액 15 μL당 추출한 DNA 100 ng을 혼합한 후 95°C에서 5분간 변성시키고, 94°C에서 45초, 68°C에서 45초, 72°C에서 45초 주기로 35회 시행하였으며, 72°C에서 5분간 연장하였다. 또 PCR 결과는 2% agarose gel에서 전기영동을 하여 그 양성 여부를 확인하였다. 이때 일차 PCR 산물은 256 염기쌍에서, 이차 PCR 산물은 181 염기쌍에서 증폭이 확인되었다.

Mpb64 primer를 이용한 MTB PCR

Mpb64 primer를 이용한 PCR은 Biocore 키트를 사용하였으며, 프로토콜에 따라 추출한 DNA 100 ng을 넣고 PCR 혼합액을 총 20 μL로 혼합한 후 one tube nested PCR을 시행하였다. 그리고 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 40초, 66°C에서 40초, 72°C에서 40초 주기로 15회 시행하고, 다시 전 cycle을 35회 반복한 뒤 72°C에서 5분 연장하였다. PCR 결과는 2% agarose gel에서 전기영동하여 양성 여부를 확인하였다. 이때 MTB PCR 산물은 170 염기쌍에서 증폭이 확인되었다. 또한 PCR 수행 여부의 적절성을 확인하기 위해 human HLA-DRB clone plasmid 및 HLA-DRB primer를 internal control로 사용하였는데, PCR 산물은 276 염기쌍에서 확인되었다.

IS6110/Rpoβ primer를 이용한 MTB PCR

IS6110/Rpoβ primer를 이용한 PCR은 Biocore 키트를 사용하였으며, 프로토콜에 따라 nested PCR을 시행하였다. 즉 첫 번째 PCR 혼합액 15 μL당 추출한 DNA 100 ng을 혼합한 후, 95°C에서 5분간 변성시키고 94°C에서 45초, 68°C에서 45초, 72°C에서 30초 주기로 35회 시행한 다음 72°C에서 5분간 연장하였다. PCR 결과는 2% agarose gel에서 전기영동을 하여 양성 여부를 확인하였는데, MTB 양성인 경우는 235 염기쌍 및 158 염기쌍 모두에서 증폭되거나, 158 염기쌍에서 증폭이 확인되었다. 그리고 NTM에 의한 감염인 경우는 235 염기쌍에서 증폭이 관찰되었다.

실시간 중합효소 연쇄반응(real-time quantitative polymerase chain reaction)

AdvanSure TB/NTM real time PCR 키트(LG Life Science, Seoul, Korea)를 이용하였으며, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 분리된 상층액 5.0 μ L를 PCR에 사용하였다. 그리고 2×PCR mixture가 10 μ L씩 분주되어 있는 200 μ L PCR 튜브를 시료의 수만큼 준비한 뒤, IS6110/Rpo β primer 5 μ L를 각각의 PCR 튜브에 첨가하고 추출한 DNA 100 ng을 첨가하였다. 그리고 이를 원심분리한 후 vortex하여 섞은 뒤, 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 변성시키고 95°C에서 10초, 62°C에서 40초 주기로 35회 시행하였다.

PCR 반응의 결과 분석은 3개의 channel을 이용하여 각각의 channel에서 FAM (MTB), Hex (NTM), Cy5 (internal control) 등 3개 파장의 signal 형성을 확인하고 그 반응의 유효성과 양성, 음성을 분석하였다. 이때 Ct 값은 internal control의 경우 26-28 사이를 나타냈으며, 35 미만을 양성으로 하였다. 각 signal 중 NTM Ct 값이 MTB Ct 값보다 클 경우는 MTB만 존재하는 것으로 보고, 작은 경우는 MTB와 NTM의 중복 감염으로 해석하였다.

결과

모든 증례에 대한 Ziehl-Neelsen 염색, PCR 및 RQ-PCR 검사와 결핵균 배양 결과를 Table 1에 기술하였다. 결핵균 배양이 실시된 24예 중 배양 양성인 경우는 15예였는데, 이 중 Ziehl-Neelsen 염색에 양성인 경우는 7예로 염색의 민감도는 46.6%였다. 또 결핵균 배양 검사상 음성인 경우는 9예였는데, 이 중 Ziehl-Neelsen 염색에 양성인 증례가 3예, 음성인 증례가 6예로 염색의 특이도는 66.6%였다. 결핵균 배양 결과에 따른 Ziehl-Neelsen 염색, PCR 및 RQ-PCR 검사의 민감도 및 특이도 비교는 Table 2에 정리하였다.

본 연구에 사용된 54개의 증례 중 15예(27.8%)가 Ziehl-Neelsen 염색에서 양성이었고(Fig. 1), 나머지 39예(72.2%)는 음성이었다. 또한 IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β primer로 PCR을 실시한 결과(Fig. 2), 전체 54증례 중 19예(35.2%), 16예(29.6%), 19예(35.2%)에서 각각 양성이었고, 35예(64.8%), 38예(70.4%), 35예(64.8%)에서 음성을 나타냈다. 그리고 IS6110/Rpo β 에 대한 PCR 결과가 양성인 19예 중 2예에서 NTM이 확인되었다(Table 3).

한편 RQ-PCR은 DNA가 불충분한 3예를 제외하고 51예에서만 시행되었는데(Fig. 3), 이 중 23예(45.1%)에서 양성이었고 28예(54.9%)에서 음성이었다(Table 4). IS6110/Rpo β 에 대한 RQ-PCR에서 양성인 23예 중 1예에서 NTM이 양성(Ct 값, 28.45)으로 확인되었는데, 이는 IS6110/Rpo β PCR에서는 음성이었다.

Table 1. Results for Ziehl-Neelsen stain, MTB PCR (IS6110 and Mpb64), MTB/NTM PCR (IS6110/Rpo β), MTB/NTM RQ-PCR (IS6110/Rpo β) and culture of mycobacteria

Ziehl- Neelsen stain	PCR			Real-time PCR RQ-PCR	Culture of Mycobac- terium
	IS6110	Mpb64	IS6110/Rpo β		
Positive	+	+	MTB+	MTB+	Not done
	+	+	MTB+	MTB+	Not done
	+	+	MTM+	MTB+	Not done
	+	+	MTB+	MTB+	Not done
	+	+	MTM+	-	Not done
	+	+	MTB+	MTB+	+
	+	+	MTB+	-	Not done
	+	+	MTB+	-	-
	+	+	MTB+	MTB+	+
	+	+	MTB+	-	-
	+	+	MTB+	MTB+	+
	+	+	MTB+	-	-
	+	+	MTB+	MTB+	+
	+	+	MTB+	-	-
Negative	+	+	MTB+	MTB+	+
	+	-	MTB+	MTB+	-
	+	-	MTB+	MTB+	Not done
	-	-	-	MTB+	+
	-	-	-	MTB+	+
	-	-	-	MTB+	Not done
	-	-	-	MTB+	+
	-	-	-	MTB+	+
	-	-	-	MTB+	-
	-	-	-	MTB+	+
	-	-	-	MTB+	-
	-	-	-	MTB+	+
	-	-	-	MTB+	-
	-	-	-	MTB+	+

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacterium; RQ-PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction.

Table 2. Comparative analysis of Ziehl-Neelsen stain, MTB/NTM PCR and RQ-PCR according to the results of mycobacterial culture in conjunction with previously reported cases

Our cases	Case No.			Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Culture positive		Culture negative		
	24	15	9		
Ziehl-Neelsen stain	Positive	10	7	3	46.6
	Negative	14	8	6	66.6
IS6110 PCR	Positive	13	7	6	46.6
	Negative	11	8	3	33.3
Mpb64 PCR	Positive	11	6	5	40.0
	Negative	13	9	4	44.4
IS6110/RRpo β PCR	Positive	12	6	6	40.0
	Negative	12	9	3	33.3
IS6110/RRpo β RQ-PCR	Positive	16	12	4	80.0
	Negative	8	3	5	55.5
Reported cases (Park et al. ²¹)		152	71	81	
Ziehl-Neelsen stain	Positive	46	41	5	57.7
	Negative	106	30	76	93.8
IS6110 PCR	Positive	61	60	1	84.5
	Negative	91	11	80	98.8
Reported cases (Selva et al. ²²)		49	45	4	
Ziehl-Neelsen stain	Positive	25	25	0	55.6
	Negative	24	20	4	100
IS6110 PCR	Positive	45	41	4	91.9
	Negative	4	4	0	100

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacterium; RQ-PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction.

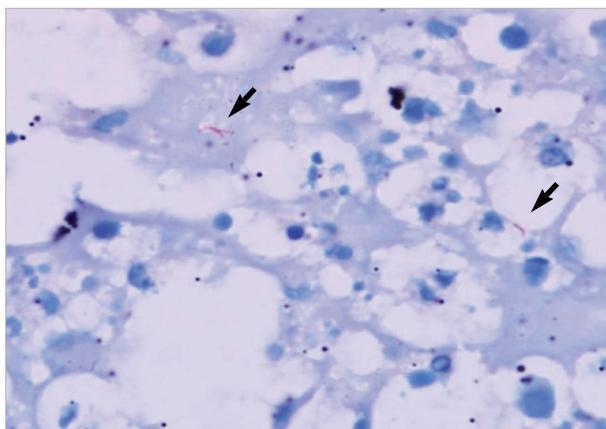


Fig. 1. Ziehl-Neelsen stain reveals several red-colored acid-fast bacilli (arrows) in a paraffin embedded tissue section diagnosed as a mycobacterial infection with chronic granulomatous inflammation in subcutis from the neck.

MTB-PCR과 RQ-PCR과의 민감도 및 특이도 비교

Ziehl-Neelsen 염색상 양성인 15증례 중에서 IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β 의 PCR 결과는 각각 11예(73.3%), 9예(60.0%), 11예(73.3%)에서 양성을 보였다. 또한 IS6110/Rpo β RQ-PCR은 15증례 중 12예(80.0%)에서 양성을 보였다. 이때 민감도는 각각 73.3%, 60.0%, 73.3%, 80.0%로 RQ-PCR이 가장

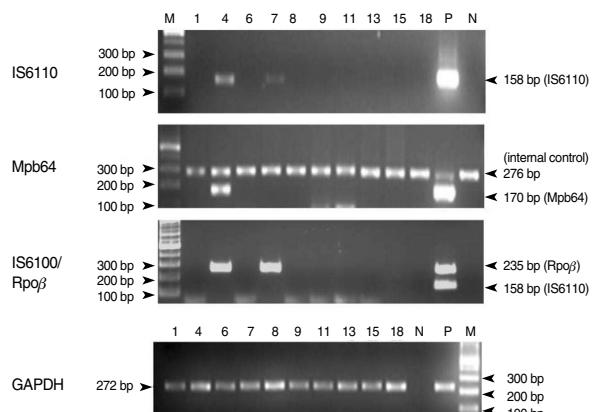


Fig. 2. Results for 2% agarose gel electrophoresis for MTB/NTM PCR and GAPDH PCR. The pictures show discrepancies in two cases (samples 4 and 7) by the difference of primers, IS6110, Mpb64 and IS6110/Rpo β PCR.

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacterium; PCR, polymerase chain reaction.

높았다. 한편 Ziehl-Neelsen 염색상 음성인 39증례 중 IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β PCR 결과는 각각 31예(79.5%), 32예(82.1%), 31예(79.5%)에서 음성이었다. 또한 RQ-PCR은 36증례 중 25예(69.4%)에서 음성이었으며, 특이도는 각각 79.5%, 82.1%, 79.5%, 69.4%로 모든 PCR이 RQ-PCR보다 높았다 (Fig. 4).

Table 3. Comparative analysis of results for Ziehl-Neelsen stain, MTB PCR (IS6110 and mpb64) and MTB/NTM PCR (IS6110/Rpo β)

PCR	Ziehl-Neelsen stain		Total No. (%)
	Positive (%)	Negative (%)	
Total No.	15 (27.8)	39 (72.2)	54 (100)
IS6110	Positive	11 (73.3)	8 (20.5)
	Negative	4 (26.7)	31 (79.5)
Mpb64	Positive	9 (60.0)	7 (17.9)
	Negative	6 (40.0)	32 (82.1)
IS6110/Rpo β	Positive	11 (73.3)	8 (20.5)
	Negative	4 (26.7)	31 (79.5)

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacterium; PCR, polymerase chain reaction.

Table 4. Comparative analysis of results for Ziehl-Neelsen stain and MTB/NTM RQ-PCR (IS6110/Rpo β)

PCR	Ziehl-Neelsen stain		Total No. (%)
	Positive (%)	Negative (%)	
Total No.	15 (29.4)	36 (70.6)	51 (100)
RQ-PCR	Positive	12 (80.0)	8 (30.6)
	Negative	3 (20.0)	25 (69.4)

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacterium; RQ-PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction.

또 결핵균 배양 양성인 15예 중에서 IS6110과 Mpb64, IS6110/Rpo β PCR 및 RQ-PCR의 민감도는 각각 46.6% (7예), 40% (6예), 40% (6예), 80% (12예)였고, 특이도는 33.3% (3예), 44.4% (4예), 33.3% (3예), 55.5% (5예)였다.

MTB-PCR과 RQ-PCR과의 위양성을 및 위음성을 비교

Ziehl-Neelsen 염색에서 양성인 15증례 중 IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β PCR 결과는 15증례 중 4예, 6예, 4예에서 음성을 보였다. 한편 IS6110/Rpo β RQ-PCR의 경우는 15증례 중 3예가 음성이었다. 또한 위음성을은 각각 26.7%, 40.0%, 26.7%, 20.0%로 RQ-PCR에서 가장 낮았다. Ziehl-Neelsen 염색에 음성인 39증례 중 각각 8예, 7예, 8예가 양성이었으며, RQ-PCR의 경우는 36증례 중 11예가 양성이었다. 또한 위양성을은 20.5%, 17.9%, 20.5%, 30.6%였다(Fig. 5).

MTB-PCR과 RQ-PCR과의 양성예측도와 음성예측도

IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β PCR과 RQ-PCR에서 각각의 양성 예측도는 57.9%, 56.3%, 57.9%, 52.2%였고, 음성 예측도는 88.6%, 84.2%, 88.6%, 89.3%였다(Fig. 6).

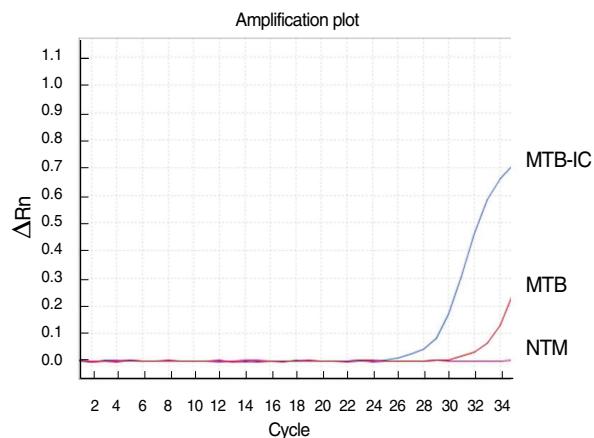


Fig. 3. Results for MTB/NTM RQ-PCR. (A) An MTM-positive and NTM-negative case. The Ct value for the internal control (MTB-IC) is 26-28; the Ct value for MTB is 32.9. (B) An MTB-negative and NTM negative case.

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacterium; RQ-PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction.

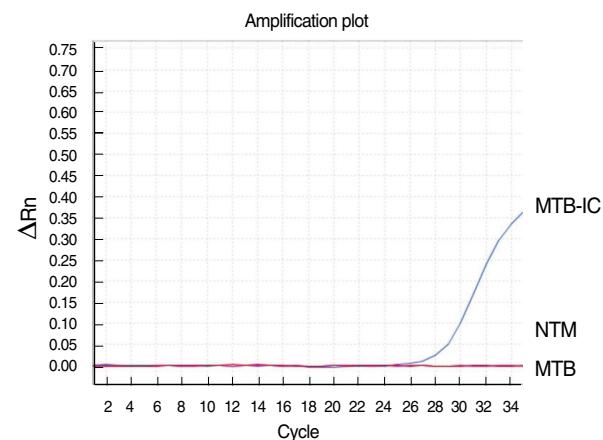


Fig. 4. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction (PCR) and real-time quantitative PCR (RQ-PCR). RQ-PCR shows the highest sensitivity and Mpb64 PCR shows the highest specificity. MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; IC, internal control; NTM, non-tuberculous mycobacterium.

고찰

병리조직에서 만성 육아종성 염증의 소견을 보이는 경우, 항산균을 포함한 다양한 원인균을 감별하는 것이 필요하므로 이에 파라핀포매 조직에서 항산균을 검출하기 위한 Ziehl-Neelsen 염색이 시행되고 있으며 최근에는 PCR 및 RQ-PCR도 시행되고 있다.

본 연구에서는 Ziehl-Neelsen의 염색 결과를 각각의 방법을 비교 분석하는 기준으로 삼았으나, Ziehl-Neelsen 염색의 민감도나 특이도가 높지 않다고 알려져 있어 결핵균 배양 결과도 참조하여 비교 분석하였으며, 파라핀포매 조직에서 기존에 보고된 자료와도 상호 비교하였다(Table 2).

결핵균 배양이 실시된 증례의 파라핀포매 조직에서 IS6110

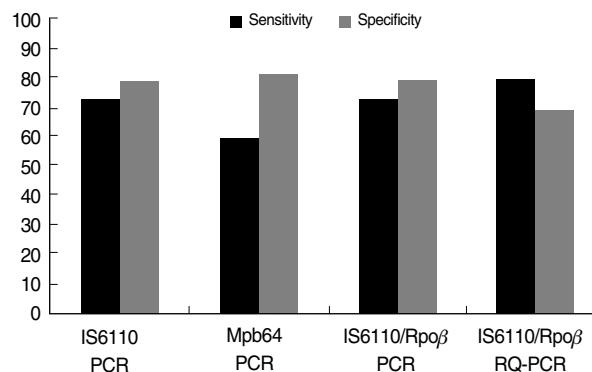


Fig. 5. False-positive and false-negative rate of polymerase chain reaction (PCR) and real-time quantitative PCR (RQ-PCR). Mpb64 PCR shows the lowest false-positive rate and RQ-PCR shows the lowest false-negative rate.

primer를 사용한 PCR 결과^{21,22}에서 PCR의 민감도는 84.5- 91.1%, 특이도는 98.8-100%로 보고되었다. 그러나 본 연구에서 결핵균 배양이 시행된 24예의 PCR 민감도는 40.0-46.6%, 특이도는 33.3-44.4%로 매우 낮은 반면, RQ-PCR에서는 80%의 민감도와 55.5%의 특이도를 보였다. 이러한 결과와 기준 보고와의 차이를 완전히 설명하기는 어려우나, 이는 파라핀 포매 조직이 갖는 한계나 조직에 있는 항산균의 개수나 분포 등에 따른 차이라고 생각된다. 또한 본 연구에서 MTB/NTM PCR에 사용된 primer 및 방법은 기준 보고와 큰 차이가 없었다.

파라핀포매 조직에서 Ziehl-Neelsen 염색으로 항산균을 확인한 빈도가 기준의 연구 보고^{13,14}에서는 0-35%로 낮았는데, 이는 조직 제작과정 중 사용되는 자일렌과 포르말린이 항산균 염색성을 감소시킨 결과라고 보여진다.^{23,24} 또한 본 연구에서도 전체 54증례 중 15예(29.4%)에서 항산균이 관찰되어 기준 보고와 유사한 빈도를 보였다.

최근에 파라핀포매 조직에서 항산균 검출에 PCR 또는 RQ-PCR이 유용하다고 알려졌으나 반면 문제점도 제기되고 있다.^{5,6} 또한 항산균 검출에 흔히 사용되는 PCR primer인 IS6110, Mpb 64 및 Rpo β 부위에 따른 결과도 연구자에 따라 차이가 보고되고 있다.^{5,7-11} 실제 본 연구를 시행하게 된 계기도 본 연구자들이 항산균 진단에 사용하던 primer를 Mpb64에서 IS6110으로 바꾸면서 primer에 따른 결과의 차이가 발견되었기 때문인데, 이는 임상에서 환자를 치료하는 데 매우 중요한 결과이므로 항산균 검출에 사용되는 PCR 및 RQ-PCR을 포함하는 다양한 방법의 검증이 필요하게 되었다.

PCR의 경우 기준의 연구들이 민감도를 83.5-100%로 보고한 반면, 본 연구의 민감도는 IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β primer에서 각각 73.3%, 60.0%, 73.3%로 나타나 기준의 보고에 비해 낮게 관찰되었다. 반면 특이도는 70-99%로 보고한 다른 연구와 비교할 때 각각 79.5, 82.1%, 79.5%로 비슷한 결과를 보였다.^{5,7-11} 한편 Ziehl-Neelsen 염색이 일반적으로 민감도가 높지 않은 방법이라고 알려져 있어 본 연구에서는 결핵균 배양

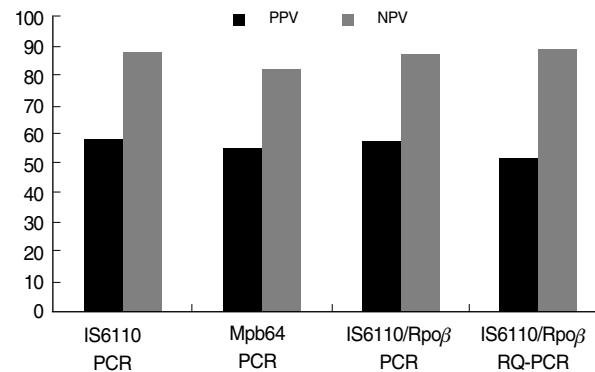


Fig. 6. Positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of polymerase chain reaction (PCR) and real-time quantitative PCR (RQ-PCR). Three different PCRs show the higher PPVs than RQ-PCR. NPV is similar in all PCRs and RQ-PCRs.

검사 결과도 추가 분석하였는데, 결핵균 배양 검사가 양성인 15예에 IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β primer를 사용한 PCR 결과는 각각 7예(46.6%), 6예(40%), 6예(40%)에서 양성으로 나타나 오히려 Ziehl-Neelsen 염색을 기준으로 하였을 때보다 더욱 낮은 민감도를 보였다.

한편 RQ-PCR은 Taqman chemistry의 형광량 측정법을 이용하므로 항산균 검출 시 기존 PCR법에 비해 뛰어난 감도를 보인다고 보고되고 있는데,¹⁶ Beqaj 등⁶은 파라핀 포매 조직에서 Ziehl-Neelsen 염색과 RQ-PCR을 시행하여 민감도 및 특이도를 비교해 본 결과, Ziehl-Neelsen 염색에 양성을 보인 검체의 RQ-PCR 민감도는 92%, 특이도는 100%라고 보고하였다. 실제로 본 연구에서도 RQ-PCR의 민감도는 80.0%로 다른 PCR 방법에 비해서는 높은 민감도를 보였으나, 기준 보고에 비하면 낮게 관찰되었다. 또한 특이도는 69.4%로 다른 PCR 방법보다 낮았고, 100%로 보고한 기준 보고에 비해서도 매우 낮았다. 하지만 결핵균 배양 검사상 양성인 15예를 분석하였을 때 RQ-PCR에서 양성인 경우가 12예(80%)로 나타나 다른 PCR 방법에 비하여 높은 민감도를 보여 RQ-PCR 방법이 파라핀포매 조직에서 항산균 검출에 가장 민감한 것을 확인할 수 있었다. 이에 Fukunaga 등⁵은 RQ-PCR이 민감도와 특이도가 높다 하더라도 Ziehl-Neelsen 염색과 달리 검체 내 모든 항산균 DNA를 발견해내므로 살아있는 항산균뿐만 아니라 대식구에 탐식된 균이나 죽어서 기질 내에 침착 되어 있는 균까지 모두 측정하게 되어 항산균 감염에 의한 질병의 활성도를 반영하지는 못함을 지적하였다.

본 실험에서 Ziehl-Neelsen 염색에 음성이었으나, IS6110과 Mpb64 및 IS6110/Rpo β PCR 및 RQ-PCR 결과가 양성인 위양성률은 각각 20.5%, 17.9%, 20.5%, 30.6%였다. 특히 RQ-PCR에서 양성이었던 3증례 중 2예는 기준 PCR 방법들에서는 모두 음성이었다. 이를 2증례의 Ct 값은 한계 값인 35에 매우 근접한 34.9 및 33.41이어서 실제로도 위양성일 가능성이 의심되었다. 이에 대해 Kim 등²⁵은 RQ-PCR의 경우 증폭 후 증폭 산물을 조작하는 과정이 없어서 위양성의 가능성성이 원칙적으로 매우 낮

으나, 다만 환자 검체의 Ct 값이 기준치 즉 한계 값에 가까이 있는 경우 위양성의 가능을 고려하여 결과를 신중히 해석하여야 한다고 하였다. 또한 나머지 1예는 RQ-PCR에서 Ct 값이 31.46으로 확실한 양성이었고 모든 PCR 방법에서도 양성이었으며, 이 환자의 흉부 사진상 우측 폐에서 공동이 관찰되었고 항결핵제 복용 후 병변이 완치되었으므로 위양성이 아닌 결핵으로 판정할 수 있었다. 이는 아마도 조직에서 항산균의 숫자가 너무 적어 Ziehl-Neelsen 염색에서 관찰되지 않았을 것으로 판단되었다.

또한 본 연구에서 PCR 및 RQ-PCR의 위음성률은 26.7%, 40.0%, 26.7%, 20.0%로 높았는데, 그 중 RQ-PCR에서 가장 낮게 관찰되었다. Cho 등⁴도 Ziehl-Neelsen 염색에서 항산균이 관찰되었으나, PCR의 경우는 추출한 결핵균 DNA의 양이 충분하지 않거나 DNA가 온전하지 않음에 기인한다고 하였다. 본 연구에서도 이들 증례에서는 대부분 항산균이 매우 드물게 적은 숫자로 관찰되었으므로 실험에 항산균이 포함되지 않았거나, 또한 파라핀 포매 조직이므로 조직 제작 단계에서 항산균 DNA의 손상으로 PCR이 음성일 가능성성이 의심되었다. 특히 multiplex PCR인 경우는 검체의 DNA 양이 좀더 많이 요구되므로 미량의 DNA인 경우 결과가 음성으로 나올 가능성성이 알려져 있다.

결론적으로 파라핀 포매 조직에서 항산균 감염 여부를 확인하는 방법으로 RQ-PCR 방법이 다른 PCR 방법보다 민감도가 높고, 위음성률이 낮으며, 음성 예측률이 높고 결핵성 및 비결핵성 항산균을 모두 검출할 수 있다는 점에서 PCR보다 더 유용하다고 판단되었다. 그러나 RQ-PCR 방법이 특이도에서 오히려 다른 PCR 방법보다 낮다는 점과 위양성률이 높다는 점은 파라핀 포매 조직에서 항산균 진단 시 유의해야 될 점으로 생각된다.

참고문헌

- Charles M, Pape JW. Tuberculosis and HIV: implications in the developing world. *Curr HIV/AIDS Rep* 2006; 3: 139-44.
- Chemal K, Portaels F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 77-83.
- Baba K, Pathak S, Sviland L, et al. Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. *Diagn Mol Pathol* 2008; 17: 112-7.
- Cho MS, Lee SN, Sung SH, Han WS. Comparison of Ziehl-Neelsen stain and TB-PCR on detection of mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of chronic granulomatous inflammation. *Korean J Pathol* 2003; 37: 379-83.
- Fukunaga H, Murakami T, Gondo T, Sugi K, Ishihara T. Sensitivity of acid-fast staining for Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed tissue. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 994-7.
- Beqaj SH, Flesher R, Walker GR, Smith SA. Use of the real-time PCR assay in conjunction with MagNA Pure for the detection of mycobacterial DNA from fixed specimens. *Diagn Mol Pathol* 2007; 16: 169-73.
- Kim CS, Son HD, Park MR, Seo JY, Cho DI, Rheu NS. Usefulness of PCR study in AFB smear negative patients on admission. *Tuberc Respir Dis* 1997; 44: 1001-10.
- Schluger NW, Kinney D, Harkin TJ, Rom WN. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 1994; 105: 1116-21.
- Choi YJ, Hu Y, Mahmood A. Clinical significance of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 200-4.
- Brugiére O, Vokurka M, Lecossier D, et al. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis using sequence capture polymerase chain reaction. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1478-81.
- 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.
- Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One* 2009; 4: 7093.
- Guckian JC, Perry JE. Granulomatous hepatitis: an analysis of 63 cases and review of the literature. *Ann Intern Med* 1966; 65: 1081-100.
- Harrington PT, Gutiérrez JJ, Ramirez-Ronda CH, Quiñones-Soto R, Bermúdez RH, Chaffey J. Granulomatous hepatitis. *Rev Infect Dis* 1982; 4: 638-55.
- Drews SJ, Eshaghi A, Pyskir D, et al. The relative test performance characteristics of two commercial assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-fixed human biopsy specimens. *Diagn Pathol* 2008; 3: 37.
- Hillemann D, Galle J, Vollmer E, Richter E. Real-time PCR assay for improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 340-2.
- Scarpellini P, Racca S, Cinque P, et al. Nested polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring treatment response in AIDS patients with tuberculous meningitis. *AIDS* 1995; 9: 895-900.
- Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2668-73.
- Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-81.
- Therese KL, Jayanthi U, Madhavan HN. Application of nested polymerase chain reaction (nPCR) using MPB 64 gene primers to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical specimens from extra-

- pulmonary tuberculosis patients. Indian J Med Res 2005; 122: 165-70.
21. Park JS, Kang YA, Kwon SY, *et al.* Nested PCR in lung tissue for diagnosis of pulmonary tuberculosis. Eur Respir J 2010; 35: 851-7.
22. Selva E, Hofman V, Berto F, *et al.* The value of polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in granulomas isolated by laser capture microdissection. Pathology 2004; 36: 77-81.
23. Fite GL, Fite CW. Dye adsorption by mycobacteria. Int J Lepr 1965; 33: 324-41.
24. Cocito C, Delville J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. Eur J Epidemiol 1985; 1: 202-31.
25. Kim YJ, Park MY, Kim SY, *et al.* Evaluation of the performances of AdvanSure TB/NTM real time PCR kit for detection of mycobacteria in respiratory specimens. Korean J Lab Med 2008; 28: 34-8.