

## 한센병에서의 정량 증합효소 연쇄반응, 조직 및 피부도말 항산균 염색 결과 간의 비교

김종필

한국한센복지협회 연구원

### Comparison of the results of quantitative real-time PCR, and AFB stain of tissue and slit skin smear in Hansen's disease

Jong-Pill Kim M.D.

*Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association*

**Background** : *Mycobacterium leprae*, the etiological agent of leprosy, is noncultivable on axenic media, so, the viability of *M. leprae* for clinical or experimental applications is often unknown. Quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assays were recently introduced as the new tools for *M. leprae* viability determination.

**Objective** : For evaluating of correlation of results of quantitative real-time PCR(16S rRNA/RLEP) & AFB stain of slit skin smear & histopathology & estimating the viability of *M. leprae*, the author studied the comparison of results of them

**Methods** : Of 46 samples from 27 patients(MB 24 cases, PB 3 cases), *M. leprae* 16S rRNA was used as RNA targets, and *M. leprae* repetitive element (RLEP) DNA was used to determine relative bacterial numbers and the viability by the quantitative real-time PCR. The ratio of 16S rRNA and RLEP as the indicator of viability was calculated. Student t test and linear Pearson correlation were done by SPSS.

**Results** : There was a correlation between between 16S rRNA/RLEP ratio and BI( $r=0.369$ ,  $p=0.012$ ), and was statistically significant between 16S rRNA/RLEP ratio and histopathological positivity of AFB( $p=0.011$ ). However there was no correlation between 16S rRNA/RLEP ratio and MI.

**Conclusions** : Although the correlation between between 16S rRNA/RLEP ratio and BI and the statistically significant between 16S rRNA/RLEP ratio and histopathological positivity of AFB, there was no correlation between 16S rRNA/RLEP ratio and MI. It needs the further evaluation the correlation about that.

※ Key word : slit skin smear, 16S rRNA/RLEP ratio, viability

## 서론

한센병은 말초신경병증이 진행할 수 있어 영구적인 장애를 남길 수 있는 피부와 말초신경의 만성 감염병이다. 복합화학요법(multidrug therapy, 이하 MDT) 보급 이후 한센병의 유병률은 큰 감소가 있었으나, 신환자 발견율의 실질적인 감소가 보이지 않는다.<sup>1</sup> 이는 한센병 평가를 위한 통상적인 접근이 한센병의 조기진단에서 덜 효과적이어서, 질병 전파가 진행되고 있다고 설명할 수 있다.

방사선호흡측정법(radiospirometry, 이하 RR)과 형광 세균생존 평가법(Live/Dead BacLight fluorescent bacterial viability)에 기초한 체외 나균 생존평가법은 각각 10<sup>6</sup> 및 10<sup>7</sup> 등의 다량의 세균을 필요로 하기 때문에, 임상 시료에서 직접 검출하기에는 적합하지 않다.<sup>2,3</sup> 세균지수(The bacterial index, 이하 BI)는 환자의 환부에 있는 항상균의 수로 치료에 의한 환자의 반응을 평가하는 전통적인 방법이다. 그러나 BI가 치료 중이나 후에도 변화하지 않고 유지되는 경우 재발이나 약물의 효과를 판단하는데 어려움을 줄 수 있다.<sup>4</sup> 방사선 호흡측정법과 형광 세균생존 평가법 모두는 많은 양의 나균이 포함된 있는 쥐 족저에서 유리된 나균의 생존 평가에 적합하지만, 동물 모델이나 감염된 배양 내에서 숙주의 반응이나 환경적 요인에 의한 나균의 생존을 관찰하는 매우 적은 수의 균을 사용하는 경우에는 매우 제한적이다. 이를 위해 나균의 생존을 평가하는 신속하고

민감한 평가법이 매우 필요하다.

최근 Martinez 등<sup>5</sup>은 임상 및 실험적 목적을 위한 나균 생존평가를 위한 도구를 제공하기 위해 역전사 정량 중합효소연쇄반응(quantitative reverse transcriptase PCR, 이하 RT-PCR)을 이용한 16S rRNA 정량과 나균 element(RLEP) DNA 정량을 이용한 방법의 나균 생존 평가에 대한 민감도와 특이도를 평가하였고, 다균형 환자의 치료 전후의 생검조직 내 나균의 생존에 판단의 가능성에 대해 보고하였다.

이에 저자는 나균 생존 평가 관점에서 기존의 피부도말 및 병리조직검사에서의 AFB염색 양상과 분자생물학적 방법에 의한 Martinez 등<sup>5</sup>의 방법과의 상관관계에 대해 조사해 보고자 한다.

## 대상 및 방법

10년(2004년-2013년)간 한국한센복지협회 연구원에 내원한 한센병 환자 중 조직생검을 2회 이상 실시한 환자 60명을 대상으로 연구를 실시하였다. 대상자의 조직생검 파라핀 불록을 확인하고, 모든 증례의 조직 슬라이드(H&E, AFB)를 검경하여 본 연구의 목적에 맞는 증례를 취합한다.

취합된 증례에 대해 병리조직검사용 파라핀 불록에서 얻은 시료(두께 10um 15조각)에서 Qiagen사의 제품(AllPrep DNA/RNA FFPE Kit)을 이용하여 실험에 사용하기 위한 DNA 및 RNA를 추출한다.

추출한 DNA를 Jadhav 등<sup>6</sup>이 제시한 바에 따라 시료에서 적절하게 DNA의 추출 여부를 확인하고, PCR 결과의 표준 정량화를 위해 인간의 13-globin유전자에 대해 RT-PCR을

※ 교신저자 : 김종필  
전자우편 : dr\_jpkim@hotmail.com  
주 소 : 경기도 의왕시 원골로 59  
한국한센복지협회(031-452-7094)

실시하였다. 또한 Martinez<sup>5</sup> 등이 제시한 바에 따라 나균 DNA에 대해서는 RLEP에 대해 RNA에 대해서는 16S rRNA에 대해 RT-PCR을 실시하였다. Jadhav 등<sup>6</sup> 및 Martinez 등<sup>5</sup>이 제시한 시발체 및 PCR 조

건을 이용하였으며 Table 1,2와 같다. PCR 결과에서 DNA 및 RNA의 양을 표준화하기 위해 대해서는 RLEP 및 16S rRNA RT-PCR 결과를 13-globin유전자에 대한 RT-PCR 결과로 나누어 상대적으로 비교하고,

Table 1. Primer and probe sequences

Target	Primers	Primer sequence
human 13-globin	PCO4	5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCACC-3'
	GH20	5'-GAA GAG CCA AGGACA GGT AC-3'
16S rRNA	ML16S rRNATaq-F	5'-GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC-3'
	ML16S rRNATaq-R	5'-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT-3'
	ML16S rRNATaq-Probe	5'-CAT CCT GCA CCG CA-3'
RLEP	MLRLEPTaq-F	5'-GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A-3'
	MLRLEPTaq-R	5'-CGC TAG AAG GTT GCC GTA T-3'
	MLRLEPTaq-Probe	5'-CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA-3'

Table 2. PCR reaction condition

Target	Reaction condition
human 13-globin	95°C, 5 min., 37cycles of: 94°C, 2 min, 55°C, 1 min, 72°C, 2 min; 72°C for 10 min.
	50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s 60°C for 1 min
16S rRNA	95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s 60°C for 1 min
RLEP	95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s 60°C for 1 min

나균의 16s RNA와 RLEP DNA의 비를 산출하여 Martinez 등<sup>5</sup>이 제시한 바에 따라 생존능력의 평가를 위해 나균의 16s RNA양을 RLEP DNA양으로 나눈 비를 산출하여, 이를 이용하여 통계 처리한다. 통계적 비교는 Student t 검사 및 각 평가

법 간의 상관관계를 측정하기 위해 피어슨 상관계수(r)을 사용한다. 모든 분석에서 alpha값은 0.05로 하였다.

## 결 과

### 염색된 검체 검증 실시

연구 목적에 맞는 취합된 증례는 총 27례이었고, 분석을 위해 확보한 검체 및 파라핀 블록은 총 46례이었고, 취합된 증례 28예 중 신환자가 19례이었고, 재발 환자는 8례이었다(Table 3A, 3B).

신환자 19명(평균 나이 54.1세) 중 남자가 13명 여자는 6명이었고, 17예에서 다균형, 2예에서 희균형이었고, 재발 환자 8명(평균 나이 56.4세) 중 남자가 7명 여자는 1명이었고, 7예에서 다균형, 1예에서 희균형이었다.

Table 3A. Summary of New case

Id	sex	age	BI	MI	type
n1	m	15	4	0	multibacillary
n2	m	20	6	1	multibacillary
n3	m	22	4	1	multibacillary
n4	m	27	5	20	multibacillary
n5	m	30	5	10	multibacillary
n6	m	31	4	30	multibacillary
n7	m	61	6	1	multibacillary
n8	m	63	4	2	multibacillary
n9	m	64	6	30	multibacillary
n10	m	69	6	30	multibacillary
n11	m	73	5	30	multibacillary
n12	m	75	5	3	multibacillary
n13	f	49	5	15	multibacillary
n14	f	51	1	0	multibacillary
n15	f	69	4	1	multibacillary
n16	f	77	5	1	multibacillary
n17	f	82	6	15	multibacillary
n18	m	74	0	0	paucibacillary
n19	m	75	0	0	paucibacillary

Table 3B. Summary of Relapse case

id	sex	age	BI	MI	type
r1	m	45	5	10	multibacillary
r2	m	49	5	20	multibacillary
r3	m	50	3	11	multibacillary
r4	m	55	5	1	multibacillary
r5	m	58	6	10	multibacillary
r6	m	64	6	0	multibacillary
r7	m	66	4	0	multibacillary
f8	f	64	0	0	paucibacillary

대상자의 조직생검 검체 및 조직검사를 위한 파라핀 블록을 확인하고, 모든 증례의 조직 슬라이드(H&E, AFB)를 검경하여 본 연구의

목적에 맞는 총 46예의 시료를 취하였다.

조직 슬라이드 AFB염색 검경하여(Fig. 1) BI가 3이하에서는 18예 모두에서 AFB균이 관찰되지 않았고, 4에서는 10예 중 6예에서 5에서는 9예 중 7예에서, 6에서는 6예 모두에서 조직 슬라이드 내에서 AFB균이 관찰되었다. 조직 슬라이드 AFB균이 관찰된 예 중 BI 기준으로 4에서는 6예 중 5예가 치료받고 있는 예로 평균 치료기간은 17.4개월이고, 5에서는 7예 중 3예가 치료받고 있는 예로 평균 치료기간은 5개월이고, 6에서는 9예 중 5예가 치료받고 있는 예로 평균 치료기간은 7.1개월이었다.

MI 기준으로는 0인 31예 중 9예에서, 그 이상에서는 15예 모두에서 조직 슬라이드 내에서 AFB균이 관찰되었다. MI 기준으로는 0이나 조직 슬라이드 내에서 AFB균이 관찰되었던 9예 중 3예는 치료받지 않은 경우 이었고 6예는 치료받고 있던 예로 치료기간은 평균 14개월(표준 편차 13.4, 중앙값 9, 최빈값 3, 최소값 3, 최대값 36)이었다. MI 기준으로는 양성인 조직 슬라이드 내에서 AFB균이 관찰되었던 15예 중 9예는 치료받지 않은 경우 이었고 6예는 치료받고 있던 예로 치료기간은 평균 7.3개월(표준 편차 6.4, 중앙값 6, 최빈값 6, 최소값 3, 최대값 20)이었다. 치료 기간 기준에서는 치료 시작 전에서는 10예 중 10예에서 조직 슬라이드 내에서 AFB균이 관찰되었고 치료 후에는 38예 중 12예에서만 AFB균이 관찰되었다. 치료 이후에도 조직 슬라이드 내에서 AFB균이 발견된 12예의 치료 기간은 평균 10.8개월(표준편차 10.1, 중앙값 6, 최빈값 6, 최소값 3, 최대값 36)이었다.

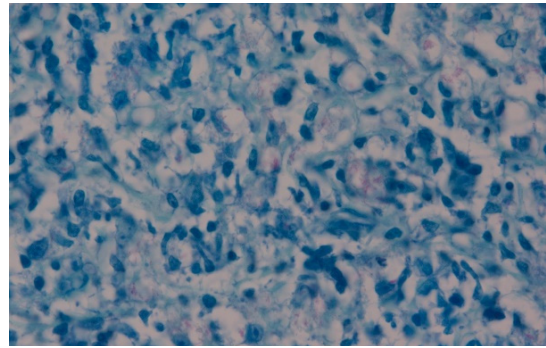
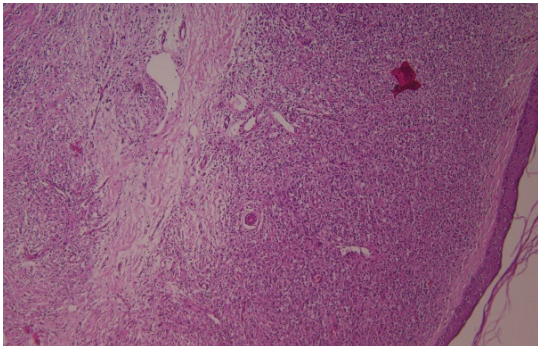


Fig. 1A Example Case of AFB+

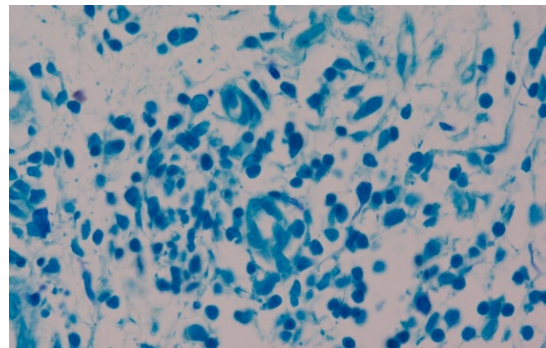
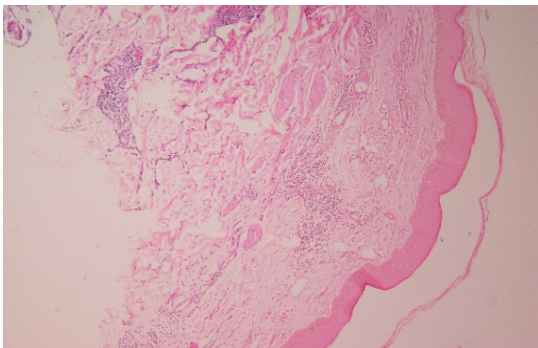


Fig. 1B Example Case of AFB-

선택된 증례 조직 슬라이드(H&E, AFB)를 검경하여 본 연구의 목적에 맞는 증례 48개의 시료 중 치료 받기 전의 시료는 10개로 신환자의 것이 9개, 재발 환자의 것이 1개이었고, 치료 받은 후의 시료는 36개이었다(Table 4A, 4B, Fig. 1). 전체 대상 조직에 대한 H&E 및 AFB염색 결과는 별첨 자료와 같다.

Table 4A. Summary of before\_treatment\_cases

	multibacillary	paucibacillary
New	9	0
Relapse	1	0

Table 4B. Summary of after\_treatment\_cases

		3months	6months	12months	24months	36months
new	multibacillary	6	6	5	4	3
	paucibacillary	0	0	0	3	0
relapse	multibacillary	0	3	1	3	2
	paucibacillary	0	0	0	0	0

조직 및 파라핀 블록에서 나균의 DNA 및 RNA 추출하여 나균에 대한 분자생물학적

검증(실시간 종합효소 연쇄반응) 실시한 결과는 파라핀 블록의 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Result of tissue samples.

Case	Tx_duration.(m)	BI	MI(%)	biposy_AFB	RNA/DNA	DNA	RNA
1	24	0	0	n	0.00	0.00	0.00
2	0	6	15	p	0.02	0.02	0.00
3	3	6	3	p	2.05	0.00	0.00
4	0	5	15	p	1.86	281.00	524.00
5	36	4	0	p	0.00	0.00	0.00
6	24	1	0	n	0.00	0.01	0.00
7	24	1	0	n	0.00	11.00	0.00
8	72	1	0	n	0.14	0.00	0.00
9	0	6	30	p	1.23	124.00	153.00
10	6	6	1	p	1.89	53.00	100.00
11	20	6	1	p	0.43	0.11	0.05
12	3	4	0	p	0.04	104.00	4.00
13	0	6	2	p	1.84	0.03	0.06
14	6	5	1	p	0.38	0.00	0.00
15	12	4	0	n	1.11	0.00	0.00
16	24	0	0	n	0.00	0.00	0.00
17	24	0	0	n	0.20	0.00	0.00
18	24	0	0	n	0.00	0.00	0.00
19	0	5	1	p	0.06	0.00	0.00
20	6	3	0	n	0.00	0.00	0.00
21	3	5	6	p	0.32	0.10	0.03
22	24	4	0	p	0.11	0.00	0.00
23	36	2	0	n	0.00	0.00	0.00
24	0	3	0	n	0.13	0.00	0.00
25	3	1	0	n	0.00	0.00	0.00
26	24	0	0	n	0.00	4.00	0.00
27	6	4	0	n	0.00	0.00	0.00
28	24	1	0	n	0.67	0.00	0.00
29	6	5	3	p	5.97	0.00	0.01
30	6	4	0	n	0.00	0.00	0.00
31	30	1	0	n	0.00	0.00	0.00
32	12	4	0	p	2.20	0.00	0.00
33	0	4	1	p	0.12	0.00	0.00
34	6	2	0	n	0.00	0.00	0.00
35	12	2	0	n	0.00	0.00	0.00
36	3	3	0	n	0.00	0.25	0.00
37	12	1	0	n	0.00	0.00	0.00
38	6	5	0	n	0.50	0.00	0.00
39	3	6	0	p	0.36	0.00	0.00
40	0	6	1	p	0.52	0.02	0.01
41	6	6	0	p	0.47	0.03	0.02
42	15	5	0	n	1.00	1.00	1.00
43	0	5	1	p	7.09	0.72	5.09
44	30	4	0	n	0.00	0.00	0.00
45	0	5	10	p	1.04	1.41	1.47
46	12	4	0	p	0.20	0.00	0.00

대상자의 치료 기간, BI, MI, 및 조직염색용 시료 불력에서 얻은 DNA 및 RNA의 실험에 의한 총 나균 RLEP DNA량, 총 나균 16sRNA량, 총 house-keeping DNA량, 나

균 RLEP DNA량에 대한 나균 16sRNA량의 비, 표준화 나균 RLEP DNA양, 표준화 나균 16sRNA 양에 대한 기술통계량은 Table 6와 같다.

Table 6. Descriptive statistics of sample

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
TX_duration	46	.0	72.0	12.761	14.1361
BI	46	.00	6.00	3.5000	2.06290
MI	46	.00	30.00	1.9783	5.44667
RNA_DNA_ratio	46	.000	7.090	.69457	1.413460
DNA	46	.00	281.00	12.6239	47.32204
RNA	46	.00	524.00	17.1465	80.89855

조직 AFB염색 양성 및 음성 간의 평균값은 Table 7과 같고, 이에 대한 t-test 결과, 총 DNA양(p=0.73) 및 총 RNA양(p=0.16)을 제외한 치료기간(p=0.02), BI(p=0.00), MI(p=0.14),

나균 RLEP DNA량에 대한 나균 16sRNA량의 비(이하 생존비)(p=0.11)에서는 통계적 유의성을 확인하였다.

Table 7. Statistics by results of biopsy AFB stain

	biopsy_AFB	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TX_duration	(+)	22	6.364	9.3836	2.0006
	(-)	24	18.625	15.3476	3.1328
BI	(+)	22	5.1364	.83355	.17771
	(-)	24	2.0000	1.66812	.34050
MI	(+)	22	4.1364	7.36333	1.56987
	(-)	24	.0000	.00000	.00000
RNA_DNA_ratio	(+)	22	1.28182	1.863697	.397342
	(-)	24	.15625	.324477	.066234
DNA	(+)	22	25.6564	66.72012	14.22478
	(-)	24	.6775	2.35027	.47975
RNA	(+)	22	35.8064	115.43355	24.61051
	(-)	24	.0417	.20412	.04167

자료간의 상관관계의 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. Results of Pearson correlation coefficient

		TX_duration	BI	MI	RNA_DNA_ratio	DNA	RNA
TX_duration	Pearson Correlation	1	-.578**	-.313*	-.272	-.213	-.183
	Sig. (2-tailed)		.000	.034	.067	.156	.223
	N	46	46	46	46	46	46
BI	Pearson Correlation	-.578**	1	.373*	.369*	.200	.191
	Sig. (2-tailed)	.000		.011	.012	.182	.204
	N	46	46	46	46	46	46
MI	Pearson Correlation	-.313*	.373*	1	.151	.591**	.555**
	Sig. (2-tailed)	.034	.011		.315	.000	.000
	N	46	46	46	46	46	46
RNA_DNA_ratio	Pearson Correlation	-.272	.369*	.151	1	.128	.164
	Sig. (2-tailed)	.067	.012	.315		.398	.277
	N	46	46	46	46	46	46
DNA	Pearson Correlation	-.213	.200	.591**	.128	1	.940**
	Sig. (2-tailed)	.156	.182	.000	.398		.000
	N	46	46	46	46	46	46
RNA	Pearson Correlation	-.183	.191	.555**	.164	.940**	1
	Sig. (2-tailed)	.223	.204	.000	.277	.000	
	N	46	46	46	46	46	46

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

BI와 치료기간( $r=-0.578$ ,  $p=0.000$ ) MI( $r=0.373$ ,  $p=0.011$ ), 생존비( $r=0.369$ ,  $p=0.012$ )과의 뚜렷한 선형 상관관계가 확인되었고, MI는 치료기간( $r=-0.313$ ,  $p=0.34$ ), 총 DNA양( $r=-0.313$ ,  $p=0.000$ ), 총 RNA양( $r=0.555$ ,  $p=0.000$ )과의 뚜렷한 선형 상관관계가 확인되었다. 생존비는 BI에서만 뚜렷한 선형 상관관계( $r=-0.369$ ,  $r=0.012$ )가 확인되었다. 또한 치료기간과 BI, MI에서 뚜렷한 선형 상관관계가 확인되었다. 치료 기간과 생존비는 치료 이전이 평균 1.39, 치료 이후는 0.50이고,  $P=0.78$ 로 통계적 의의는 없었고, 피어슨 상관계수는  $-0.272$ ,  $P$ 는 0.67로 통계적 의의는 없었다. BI와 생

존비는 0인 경우 평균 0.04, 1 이상에서 0.77이고,  $P=0.29$ 로 통계적 의의는 없었으나, 피어슨 상관계수는 0.369,  $P$ 는 0.011로 상관관계가 다소 있었다. MI와 생존비는 0인 경우 평균 0.23, 그 이상에서 1.65이고,  $P=0.021$ 로 통계적 의의는 있었으나, 피어슨 상관계수는 0.151,  $P$ 는 0.315로 통계적 의의는 없었다. 표준화 나균 DNA양과 생존비는 0인 경우 평균 0.48, 그 이상에서 1.04이고,  $P=0.202$ 로 통계적 의의는 없었고, 피어슨 상관계수는 0.128,  $P$ 는 0.398로 통계적 의의는 없었다. 표준화 나균 DNA양과 MI(피어슨 상관계수= $0.591$ ,  $P=0.000$ )은 다소 높은

상관관계가 있었고, 표준화 나균 RNA양(피어슨 상관계수=0.94, P=0.000)은 아주 높은 상관관계가 확인되었다. 표준화 나균 RNA양과 생존비는 0인 경우 평균 0.25, 그 이상에서 1.82이고, P=0.024로 통계적 의의는 있었으나, 피어슨 상관계수는 0.164, P는 0.277로 통계적 의의는 없었다. 표준화 나균 RNA양과 MI(피어슨 상관계수=0.558, P=0.000)은 다소 높은 상관관계가 있었고, 표준화 나균 DNA양(피어슨 상관계수=0.94, P=0.000)은 아주 높은 상관관계가 확인되었다.

조직 AFB염색 결과와 생존비는 음성인 경우 평균 0.15, 양성인 경우 1.28이고, P=0.011로 통계적 의의가 있었다. BI과 생존비(피어슨 상관계수=-0.578, P=0.000), 치료기간(피어슨 상관계수=-0.578, P=0.000), MI(피어슨 상관계수=-0.373, P=0.010) 간의 상관관계가 확인되었다. MI와 치료 기간(피어슨 상관계수=-0.313, P=0.034), BI(피어슨 상관계수=0.373, P=0.011), 및 DNA양(피어슨 상관계수=0.591, P=0.000), 및 RNA양(피어슨 상관계수=0.555, P=0.000) 간의 상관관계가 확인되었다.

## 결론 및 고찰

한센병은 만성 마이코박테아 감염병이다. 그 원인체인 나균은 체외배양이 안 된다. 그러한 이유로 나균 생존 평가 관점에서 여러 접근법에 대한 노력이 있었다.

한센병에서 보편적으로 나균에 특이하지 않은 Ziehl Neelsen이나 Fite Faraco 염색을 통한 항산균의 존재 여부에 따라 다른 피부 육아종 질환과의 감별이나 진단을 하고 있다. 시료에 있는 다른 AFB균이 함께 염색될

수도 있기 때문에, 이는 나균에 특이하지 않은 결과 일수도 있다. AFB염색은 신뢰할 수 있는 확인을 위해서 단위 그림 당 104개 이상의 미생물이 필요하기 때문에<sup>7</sup>, 특히 AFB균이 드물거나 없고 임상증상과 신경침범에 기초한 진단을 기초한 결핵양형 환자나 치료를 종결하고 재발의 가능성을 관찰하는 환자에서 민감도는 낮다. Torres 등<sup>8</sup>은 병리조직검사가 AFB균을 확인하는데 특히 다종형에서 가장 민감하다고 보고하였는데, 이는 한센병 진단을 위한 병리조직검사가 가장 추천되는 방법이라는 것과 일치하고<sup>9</sup>, 코 점막부를 포함한 피부도말 검사 역시 높은 AFB균 확인율을 확인되어, 치료 중 환자를 관찰하기에는 데 이용하기에 덜 침습적이라고 보고하였다.

나균의 생존 판단은 순수배지에서의 배양이 안 돼 매우 어렵다. 1960년대 Shepard<sup>10</sup> 등에 의해서 쥐족저에서의 나균 증식에 대한 방법이 소개된 이후, 이를 이용한 나균의 생존에 대해 평가가 있었다.<sup>11</sup> 그러나 이는 체외 숙주세포에 대한 나균의 반응에 대해 연구로는 많은 시간과 노동 및 비용이 필요한 실용적이지 못한 방법이다. 만약 약제 감수성 휴면균이나 약제 내성균에 의해서 재발이 발생하였거나 재발의 우려가 있는 환자의 관찰을 위해 쥐접종방법을 이용한다.<sup>12</sup>

쥐 족저에서 유리된 다량의 나균이 나병 연구에 이용될 때, 나균에 의한 [14C]palmitate의 산화율을 기초로 세균의 생존을 평가하는 것에 방사선호흡측정법을 사용을 1988년 Franzblau<sup>13</sup>가 보고하였다. RR은 쥐족저에서 성장과 상관성이 발견되었고<sup>2</sup> 새로운 약물의 나균에 대한 평가 판정<sup>14</sup>, 및 자외선<sup>15</sup>이나, 감마선<sup>16</sup> 조사 등과 같은 다양한 환경에서 생존 평가에 이용되었다. 그러나 RR에 기초한 나균

생존검사는 많은 양( $10^7$ )의 균을 필요로 하기 때문에 적은 수의 균을 이용하는 실험이나 임상적 목적으로는 그 사용이 제한된다.<sup>3</sup> 또한 RR은 방사선 물질을 이용하기 때문에 많은 지역에서 사용이 어렵다. 최근 나균의 생존 평가를 위한 형광에 기초한 방법(Live/Dead BacLight bacterial viability assay)이 개발되었다.<sup>3</sup> 세포막 무결성에 기초하는데, 나균 생존에 대한 MFP와 RR와 상관성이 확인되었다. 그러나 평가를 위해 비교적 많은 수의 균을 사용하기 때문에, 적은 수의 균을 이용하는 경우에는 사용에 제한이 된다.

많은 감염병에서 병원체를 확인하기 위한 분자생물학적 방법을 이용한 신뢰할 수 있고 민감도가 높은 진단 도구가 개발되었다. 나균 DNA에 대한 임상 시료에서 미생물을 민감성 및 특이성이 있고 신속하게 확인하는 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction (PCR))을 이용하고 있다. 나균 특이 유전자 부위(36-kDa antigen,<sup>17,18</sup> 18-kDa antigen<sup>19</sup>, 65-kDa antigen<sup>20</sup> RLEP<sup>21,22</sup>)에 대한 PCR 및 DNA 탐침자를 위한 다른 대상서열을 이용한 많은 보고가 있다. Torres 등<sup>8</sup>은 102개의 세균을 검출할 수 있는 나균 36-kDa 항원을 코딩하는 유전자에 대한 PCR방법이 이론적으로 다른 방법에 비해 가장 민감하다고 MI 양성 집단에서의 PCR에서는 100% 확인되었다고 보고하였고, 환자의 치료 중후의 관찰에 유용하다고 보고하였다. 일부 다균형 환자에서 현미경학적 검사에서 어떤 AFB균이 보이지 않았던 일부환자에서 PCR 양성인 관찰되었다고 보고하였다.<sup>8,23</sup> 비록 죽은 균의 DNA가 증폭될 가능성이 있지만, 만약 죽은 균이 죽은 후에도 오랜 기간 숙주 조직 내에서 DNA의 커다란 조각이 있다면 이는

놀라운 일이다.<sup>24</sup> PCR양성과 나균의 생존 간의 관계는 여러 저자들에 의해 보고되었고, 적은 수의 세균을 갖은 환자에서는 매우 의미가 있다<sup>21,25</sup>고 하지만, DNA를 기초로 한 PCR은 균의 생존을 구분할 수 없어, 생체외 단기간 실험과 임상적 평가에서의 약물 효과에 대한 정보를 제공하기에는 중요한 한계가 있다. 나균 DNA증폭과 생존 간의 가능한 관계를 결정하기 위해 잘 통제된 연구가 필요하다.

그러나 DNA를 기초로 한 PCR은 균의 생존을 구분할 수 없어, 치료가 종료된 후에도 오랜 기간 일부 다균형 환자에서 나균 DNA의 양성의 지속은 재발에 대한 진단적 검사로서의 PCR양성으로 나오며, 생체 외 단기간 실험과 임상적 평가에서의 약물 효과에 대한 정보를 제공하기에는 중요한 한계가 있다. 더 진행된 연구기 결과에 대한 임상적 의미를 결론을 얻기 위해 아직도 필요하다. RNA의 손상은 세포가 죽으면 비교적 빠르게 이루어지기 때문에<sup>26</sup>, 나균 RNA의 검출은 병원성 마이코박테리아에 대한 생존을 측정하고, 빠르게 평가하기 위한 유망한 도구이다. 결핵균의 85B (alpha antigen) mRNA, 16S rRNA, and IS6110 DNA에 대한 RT-PCR을 이용한 방법이 화학요법의 평가를 위한 의미 있는 표지자로 소개되었다.<sup>27</sup> 결핵 치료 이후 어떤 환자에서는 얻은 객담에서 DNA가 확인되는 동안에 객담에서 결핵균의 mRNA는 빠르게 소실되는 것이 확인되었다. 생존 예측표지자로서의 나균 16S rRNA를 이용한 RT-PCR가 치료받은 환자의 피부도말검사 시료<sup>28,29</sup>를 포함한 임상시료<sup>30</sup>에서 나균의 검출과 그 생존을 평가하기 위한 적합한 대상으로 확인되었다.

최근 Martinez 등<sup>5</sup>은 임상 및 실험적 목적

을 위한 나균 생존평가를 위한 도구를 제공하기 위해 두 가지 역전사 정량 중합효소연쇄반응(quantitative reverse transcriptase PCR, 이하 RT-PCR)을 개발하였다. RNA 대상으로 나균 sodA mRNA 및 16S rRNA를 이용하였고, 세균 수의 상대적 평가를 위해 DNA 대상으로 나균 element (RLEP) DNA를 이용하였고, 16S rRNA/RLEP RT-PCR 나균 생존평가법은 단기간의 실험적 목적이거나, 치료의 효과를 평가하기 위한 조직 생검 시료의 나균 생존의 예측에 유용하다. 반면 sodA/RLEP RT-PCR 나균 생존평가법은 단기간의 연구목적에만 제한되어 이용할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 BI 및 조직 AFB 염색 결과와 나균 RLEP DNA 량에 대한 나균 16sRNA 량의 비에서만 통계적 의의는 있었다. BI의 경우 나균 RLEP DNA 량에 대한 나균 16sRNA 량의 비와 양성 음성간의 통계적 유의성은 없었으나, 약간의 상관관계를 확인하였다. 이는 검사 대상 수가 적어 BI을 양성과 음성으로 나누어 비교하여 각 BI 간의 통계적 비교가 되지 못한 결과로 사료된다. MI의 경우는 나균 RLEP DNA 량에 대한 나균 16sRNA 량의 비와 양성 음성간의 통계적 유의성은 없었으나, 상관관계가 없는 것으로 확인되었으나, 표준화 DNA 및 RNA 양과는 다소 높은 상관관계가 확인되었다. 이는 MI가 전통적인 나균의 생존 평가에 이용된다는 점과는 상이한 결과를 얻었는데, 양성 음성 간에는 통계적 유의성을 보인 것으로 보아 MI는 BI에 비해 값의 구간이 넓어 조사 대상 수가 적은 것에 영향을 받은 것으로 사료된다. 이에 대해서는 향후 좀 더 많은 대상에 대해 실험해 볼 필요가 있다고 사료된다. 표준화 RNA와 MI와의 상관관계는 그간 알려진 바

에 타당한 것으로 사료되나, DNA 양은 BI와는 의미 있는 상관관계가 관찰되지 않았고 (피어슨 상관계수=0.2,  $p=0.182$ ), MI와는 다소 높은 상관관계가 확인되었는데, 이것이 본 실험의 자료 특성에 의한 것인지 등에 대해 차후 실험이 필요할 것으로 사료된다. 이는 처음에 기대한 바에 비해 만족한 결과는 아니라고 사료된다. 그러나 MI가 전통적으로 나균의 생존에 대한 평가로 이용되었다는 점에서 방법론적인 접근으로는 의미 있는 결과로 사료되므로, 차후 DNA 및 RNA의 추출 방법의 개선 및 PCR 조건에 대한 다양한 시료를 통한 최적화가 필요할 것으로 사료된다. 또한 이 검사적 접근이 좀 더 임상적으로나 사업적인 측면에서의 활용을 전제한다면 향후 연구에서는 정량적 한계점을 제시할 수 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. Lancet 2004;363:1209-1219.
2. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2001;69(1):1-12.
3. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. J Med Microbiol. 2005;54:235-242.
4. Srinivas D, Rao PN, Lakshmi TS, et al. Bacterial index of granuloma and its relevance compared to BI of skin smears. Lepr Rev. 2002;73(1):79-80.
5. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, et al. Molecular determination of *Mycobacterium*

- leprae viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2124-2130.
6. Jadhav RS, Macdonald M, Bjune G, et al. Simplified PCR detection method for nasal *Mycobacterium leprae* *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001;69(4):299-307.
  7. Shepard CC, McRae DHA. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr.* 1968;36:78-82.
  8. Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev.* 2003;74(1):18-30.
  - 9 WHO. Staining. Chapter 5. Histopathological examination and classification. *Laboratory Techniques.* WHO 1987, pp37-40.
  10. Shepard CC, McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1968;36(1): 78-82.
  11. Welch TM, Gelber RH, Murray LP, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* after multiplication in mice. *Infect Immun.* 1980;30(2):325-328.
  12. Constant-Desportes M, Guelpa-Lauras C, Carolina J et al. A case of relapse with drug susceptible *M. leprae* after multidrug therapy. *Int J Lepr.* 1991;59:242-247.
  13. Franzblau SG. Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. *J Clin Microbiol.* 1988;26(1):18-21.
  14. Franzblau SG, Biswas AN, Jenner P, et al.. Double-blind evaluation of BACTEC and Buddemeyer-type radiorespirometric assays for in vitro screening of antileprosy agents. *Lepr. Rev.* 1992; 63:125-133.
  15. Truman RW, Gillis TP. The effect of ultraviolet light radiation on *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 2000;68:11-17.
  16. Adams LB, Soileau NA, Battista JR, et al. Inhibition of metabolism and growth of *Mycobacterium leprae* by gamma irradiation. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 2000;68:1-10.
  17. De Wit MYL, Faber WR, Krieg SR et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *M. leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol.* 1991;29:906-910.
  18. Hartskeerl RA, De Wit MYL, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *M. leprae*. *J Gen Microbiol.* 1989;135: 2357-2364.
  19. Williams DL, Gillis TP, Booth RJ et al. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *M. leprae*. *J Infect Dis.* 1990;162:193-200.
  20. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *M. leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J Clin Microbiol.* 1990;28:1913-1917.
  21. Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *M. leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *Fems Microb Lett.* 1989;65:305-310.
  22. Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *M. leprae*. *Mol Microbiol.* 1990;4:1745-1751.
  23. Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN et al. Use of PCR -mediated amplification of *M. leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol.* 1993;39:298-304.
  - 24 Rafi A, Donoghue HD, Stanford JL. Application of polymerase chain reaction for the detection of *M. leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients. *Int J Lepr.* 1995;63:42-47.

25. Jamil S, Keer JT, Lucas SB, et al. Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. *Lancet*. 1993;31:342(8866):264-268.
26. Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36: 1352-1356.
27. Desjardin LE, Perkins MD, Wolski K, et al. Measurement of sputum *Mycobacterium tuberculosis* messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;160:203-210.
28. Jadhav RS, Kamble RR, Shinde VS, et al. Use of reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in the slit-skin smears of leprosy patients. *Indian J. Lepr.* 2005;77:116-127.
29. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supakul P, et al. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006;3:319-328.
30. Hirawati, Katoch K, Chauhan DS, et al. Detection of *M. leprae* by reverse transcription-PCR in biopsy specimens from leprosy cases: a preliminary study. *J. Commun. Dis.* 2006;38: 280-287.