

Calcofluor White 염색법을 이용한 주폐포자충 폐렴의 조기 진단

울산의대 서울중앙병원 내과학교실, 미생물학교실*
아산 생명과학 연구소*

송재훈 · 최정은 · 주용선 · 고윤석 · 김양수
유 빈 · 조 영 주* · 김 원 동 · 김 유 겸*

— Abstract —

Early Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by Calcofluor White Stain in Bronchoalveolar Lavage Fluid

Jae-Hoon Song, M.D., Jeong Eun Choi, M.D., Yong Sun Joo, M.D., Yoonsuck Koh, M.D.

Yang Soo Kim, M.D., Bin Yoo, M.D., Young Joo Cho, M.D.*

Won Dong Kim, M.D. and Yoo Kyum Kim, M.D.*

Departments of Internal Medicine and Microbiology*, Asan Medical Center, College of Medicine,
University of Ulsan and Asan Institute for Life Science*, Seoul, Korea

To evaluate the clinical efficacy and usefulness of Calcofluor white stain in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP), we performed Calcofluor white stain in bronchoalveolar lavage fluid from 10 compromised patients with fever, dyspnea, and diffuse pulmonary infiltrates. Four of 10 cases showed positive staining for *P. carinii* with Calcofluor white staining. Underlying diseases were ALL, AML, AIDS, and Pinealoblastom, respectively. These patients had been treated with Bactrim for 2 or 3 weeks with complete cure. Calcofluor white stain has clear advantages over conventional staining methods such as Gomori methenamine silver, Toluidine blue O, or Giemsa stain in terms of speed and simplicity of the technique. This method is believed to be suitable for early diagnosis of PCP. Application of this rapid diagnostic method to suspected cases with febrile pneumonitis syndrome will increase the detection rate of PCP in Korea.

서 론

주 폐 포 자 충 폐 렴 (*Pneumocystis carinii* pneumonia, PCP)은 면역 기능이 억제 되어 있는 환자에게서 발생하는 호흡기계의 주요 기회 감염 중의 하나이다¹⁾. PCP의 발생 빈도는 악성 종양을 갖는 환자나 최근에 문제가 되고 있는 후천성 면역결핍증(AIDS) 환자의 수가 증가함에 따라 함께 증가하고 있다^{2,3)}. 또한 이 질환은 치료를 하지 않는 경우 치명적이나, 일단 진단이 되어 적절한 항균 요법을 하면 완치가 가능하다는 이유에서 조

기 진단이 임상적으로 매우 중요한 의미를 갖는다⁴⁾. PCP의 조기진단은 임상적으로 기저 면역기능이 억제된 환자에게 간질성 폐렴을 동반하는 호흡 곤란 및 저산소증이 있는 경우 일단 의심할 수 있으나²⁾, 증상 소견이 특이하지 않고 흉부 방사선 소견 역시 다양하며 심지어 정상으로 나타날 수도 있어⁵⁾ 임상 진단만으로는 불충분하다. PCP의 확진을 위해서는 폐조직이나 호흡기 분비물 등에서 *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*)를 증명하는 것이 필요하다. 이러한 세균학적 증명을 위해 사용되고 있는 염색법들로 Gomori Methenamine Silver (GMS) 염색을 비롯하여 Toluidine blue O, Gram-

Weigert, Papanicolaou, Giemsa 염색 등이 있으나, 대개 시간이 많이 걸리고 염색 방법 자체가 복잡하여 임상적 유용도가 떨어진다⁶⁻⁹⁾.

Calcofluor White(CFW) 염색은 cellulose나 chitin 등의 물질에 존재하는 다당(polysaccharide)과 결합하는 특성을 이용한 형광 염색법으로 원래 진균 염색에 이용되던 방법이다¹⁰⁾. 그러나 CFW 염색이 *P. carinii*의 낭포(cyst)를 염색하여 검출할 수 있음이 알려지고¹¹⁾, 이를 실제 환자의 검체에서 적용한 결과 기존의 GMS 염색에 비하여 예민도 및 특이도가 떨어지지 않는다는 사실이 보고된 바 있다¹²⁾. CFW 염색법의 가장 큰 장점은 우선 방법 자체가 아주 간단하여 쉽게 할 수 있고, 검사 소요 시간을 현저히 단축할 수 있다는 데 있다.

이에 저자들은 면역 기능이 억제된 환자들에서 간질성(間質性) 폐렴이 발생한 경우 기관지 내시경을 통해 얻은 폐포세척액에서 CFW 염색을 시행함으로써 이 방법의 진단적 가치와 임상적 유용도를 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자(Table 1)

대상 환자는 1991년 3월부터 1992년 3월까지 아산재단 서울중앙병원에 입원한 환자중 기저 질환으로 면역 기능이 떨어져 있으며 미만성 폐침윤을 보인 환자들이었다. 환자들의 기저 질환은 AIDS 1예, Acute lymphocytic leukemia (ALL) 1예, Acute myelocytic leukemia (AML) 1예, Chronic lymphocytic leukemia (CLL) 1예, Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) 1예, 신장 이식 2예, 비장 적출술 1예, pinealoblastoma 1예, 폐암 1예였다. 이중 PCP의 중요한 선행 상태인 스테로이드 투여를 받은 적이 있는 환자는 4명이었으며, 모든 레가 고열, 호흡 곤란 및 저산소증, 미만성 간질성 폐침윤 등의 소견을 보였으며, 초기 세균 배양검사 상 음성이었으며 항균 요법을 48-72시간 시행한 후에도 임상적인 호전이 없었던 예들이었다.

2. 검체의 채취

초기 항균 용법에 반응을 보이지 않고 임상적으로 PCP가 의심되는 경우 즉시 기관지 내시경을 시행하여 폐포세척액을 얻었다. 폐포세척액은 고식적인 방법으로 최소한 15-20 ml를 얻어 CFW 염색에 이용하였다.

Table 1. Characteristics of Patients with Febrile Pneumonitis Syndrome and Results of Calcofluor White Stain

No.	Age/Sex	Underlying disease	Steroid or cytotoxic Tx.	Clinical & X-ray findings	Bacteriologic data	CFW stain	Tx.	Outcome
1	33/F	AIDS	-	+	-	+	bactrim	cure
2	19/M	ALL	+	+	-	+	bactrim	cure
3	75/F	ITP	+	+	-	-	antibiotics	cure
4	69/F	CLL	+	+	Acinetobacter	-	antibiotics	imp
5	25/M	splenectomy	-	+	-	-	antibiotics	cure
6	50/F	pinealoblastoma	+	+	-	+	bactrim	cure
7	20/M	renal transplantation	+	+	Klebsiella	-	antibiotics	imp
8	43/F	renal transplantation	+	+	Enterococcus	-	antibiotics	imp
9	44/M	lung ca	+	+	-	-	antibiotics	imp
10	23/M	AML	+	+	-	+	bactrim	cure

3. CFW 염색 과정

1) 검체의 처리

(1) 폐포세척액을 5분간 1,000 g의 속도로 원심 분리한 후 상층액을 버린다.

(2) 침전물을 확인하여 만일 적혈구의 오염이 있는 경우 용해액(1.09 g KHCO_3 + 8.12 g NH_4Cl in 1 L sterile H_2O)으로 용해시킨 후 다시 원심 분리한다.

(3) 침전된 세포를 hemocytometer에 놓고 1 mm^2 내의 세포의 수를 확인한다. ($4 \times 10^5/\text{ml}$ 이상이면 적합)

(4) 1 mL를 각 slide에 놓은 후 10분간 1,000 g의 속도로 원심 분리하고 공기중에 건조시킨다.

2) CFW 염색

(1) slide를 100% methanol에 2분 간 넣은 후 공기 건조시킨다.

(2) CFW staining solution (Fungi-Fluor kit, Polysciences, Warrington, PA)을 6방울 떨어뜨리고, 1분 간 실온에서 방치한다.

(3) slide를 증류수로 세척한 후 coverglass를 얹고 형광 현미경으로 *P. carinii*의 낭포 유무를 확인한다.

찰되어 PCP로 진단할 수 있었다(Fig. 1). CFW양성으로 확인된 환자는 AIDS 1예, 스테로이드를 포함한 항암 치료를 받은 ALL 1예, Pinealoblastoma로 항암 치료와 방사선 치료를 받은 환자 1예, 그리고 AML 1예였다. 이 4명의 환자들은 CFW 염색의 결과를 확인한 즉시 Bactrim (Trimethoprim 20 mg/kg/d)을 투여하였으며, 투여 후 전 예에서 폐 침윤의 소실 및 임상 증상의 호전을 보였다. 치료 기간은 AIDS 환자의 경우 PaO_2 40이하의 심한 저산소증을 보여 기도 삽관 후 기계호흡을 하면서 Bactrim과 함께 스테로이드를 동시에 투여하였으며, 3주일 간의 치료로 완치되었다.

반면, CFW 염색 상 음성을 보인 6예의 경우 결국 광범위 항균제나 항진균제의 사용만으로 호전을 보여 PCP가 아님을 재확인하였다. 특히 CLL 환자는 추후 확인된 혈액배양 검사 상 *Acinetobacter*가 확인되었으며, 신장 이식 환자들은 각각 개담 배양 검사상 *Klebsiella*와 *Enterococcus*가 확인되었다. 이러한 균종이 폐렴의 실제 병원균이었던 지는 확인할 수 없으나, 이에 준한 항균 요법으로 폐렴은 치유되었다(Table 1).

결 과

고 찰

총 10명의 환자 중 4명에서 CFW 염색상 특징적인 콩깍지 모양(또는 double parenthesis 모양)의 낭포가 관

*P. carinii*는 1906년 Chagas에 의해 처음 확인된 이래 세균 분류학적인 측면에서 계속 논란이 있어 왔다.

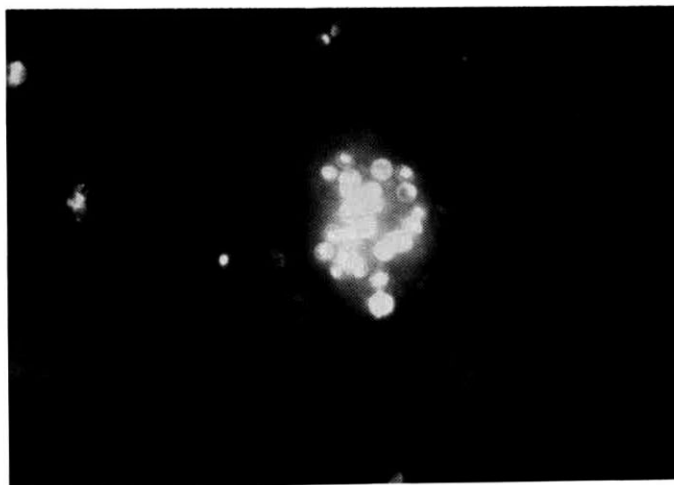


Fig. 1. Characteristic morphology of *Pneumocystis carinii* on Calcofluor white staining. Multiple cysts of bean-shaped or double-parenthesis were noted in bronchoalveolar lavage fluid

Chagas는 이를 Trypanosome일 것으로 생각하였으나, Delanoes등에 의하여 새로운 기생충으로 재조정되었다¹³⁾. 그러나, 최근의 ribosomal RNA 연구에 의하면 *P. carinii*는 기생충보다는 진균 쪽에 가까운 것으로 알려지고 있다¹⁴⁾. 이러한 분류 상의 해결은 새로운 치료적 접근이나 배양 방법 등의 개발에 근거가 될 수 있다는 점에서 중요하다. *P. carinii*는 형태, 항원층 제제에 대한 반응과 인공 배지에서 배양이 불가능하다는 점은 원충의 특성과 맞으나, 염색상, 공기 전염, ribosomal RNA subunit등의 특성은 진균 쪽에 가깝다. 이러한 염색상의 특성으로 *P. carinii*는 원래 진균 염색제인 Calcofluor white에 염색이 되고 이를 임상에서 이용할 수 있게 된 것이다.

*P. carinii*는 형태학적으로 낭포(cyst), 포자소체(sporozoite), 영양형(trophozoite)의 3단계로 구별되어¹⁵⁾, 각 발육 단계마다 검출을 위한 염색의 방법에 차이가 있다. 낭포는 구형 또는 원추형의 모양으로, 5-8 μ m의 직경을 가지며 내부에 포자소체를 다량 함유한다. 영양형은 낭포와 포자소체의 중간 단계로 생각되며, 직경 2-5 μ m의 크기를 갖는다. 기존의 염색법 중 GMS 염색이나 toluidine blue O등은 낭포벽을 염색하여 *P. carinii*를 검출하는 방법이다. 이 방법들은 smear나 조직 표본을 바로 검체로 이용할 수 있고 결과 판독이 쉬운 것이 장점이나, 방법 자체가 까다롭고 시간이 많이 소요된다는 단점을 지닌다. Giemsa 염색이나 Gram-Weigert염색은 포자소체와 영양형을 동시에 염색할 수 있으며, 빠르고 하기 쉽다는 장점이 있는 반면 숙주 세포도 같이 염색이 되어 결과 판독에 숙련된 전문가가 필요하다는 단점이 있다. 최근에 개발되어 이용되고 있는 낭포벽과 영양형에 대한 단세포균항체를 사용하는 형광 염색법 역시 낭포와 영양형을 동시에 검출할 수 있다^{16,17)}.

본 연구에서 시행한 CFW 염색은 GMS 염색과 같이 낭포벽을 염색하는 방법이며, 본 연구의 결과 이 방법이 실제 임상에서 상당히 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다. CFW 염색의 가장 큰 장점은 기존의 염색법에 비하여 검체의 처리 및 염색의 과정이 극히 간단하다는 점이다. 폐포 세척액을 채취하여 이를 처리하는 과정에 약 2시간 이상의 시간이 소요되나 기술 상의 난점은 없고, 이러한 검체 처리 과정이 끝나고 염색하는 데 걸리는 시간은 약 5분이며, 이를 형광 현미경으로 확인하는

과정만으로 모든 검사 과정이 끝나므로 특별한 문제없이 손쉽게 검사할 수 있다. 즉, 의심되는 환자에서 기관지 내시경을 하고 폐포 세척액을 얻으면 3시간 이내에 그 결과를 확인할 수 있어 조기 진단에 적합하다고 생각된다. 또한 이 방법이 PCP의 진단에 있어 예민도 및 특이도가 뛰어남을 확인하였다. 본 연구에서는 기존의 표준 검사법인 GMS 염색과의 비교 연구를 하지는 않았으나, 이미 Kim등에 의하여 CFW 염색과 GMS 염색의 비교 연구는 이루어진 바 있다¹²⁾. 이 연구 결과에 따르면 총 116검체 중 15개가 양 염색 모두에 양성으로, 4개는 GMS 염색은 음성이나 CFW 염색에 양성으로, 1개는 CFW 염색은 음성이나 GMS 염색이 양성으로 나왔고, 96개의 검체는 양 염색 모두 음성으로 나왔다. 즉, CFW 염색이 기존의 GMS 염색에 비하여 예민도에 있어 전혀 뒤떨어지지 않고 오히려 GMS 염색상 음성이었던 예들에서도 검출 가능함을 확인한 바 있다. 특히 CFW 염색 후 형광 현미경 상의 낭포의 모양이 아주 특징적이어서 전문가가 아니라도 쉽게 판별할 수 있으며, 위양성의 가능성이 없다는 점도 이 검사법의 장점이라 볼 수 있다.

PCP의 진단에 있어 사용되는 검체로는 우선 객담이 있다. 대개의 PCP 환자가 검사에 충분한 양의 객담 배출이 없는 것이 통례이므로, 초음파 분무기를 이용하여 식염수를 들이 마시게 한 후 채취하는 induced sputum이 요구된다. 이러한 induced sputum을 이용한 염색은 검사법의 예민도가 77%, negative predictive value가 64%으로 일차적으로 이 검체를 이용한 검사법이 PCP의 가능성을 알려줄 수 있으나, 음성일 경우 확실히 아니라고 단정할 수 없는 단점이 있다^{18,19)}. 본 연구에서는 이러한 induced sputum을 이용한 CFW 염색은 시행하지 않았다. 현재까지 PCP를 진단하기 위한 가장 좋은 검체는 폐포 세척액이나 경기관지 폐 생검 조직, 또는 open lung biopsy를 통한 폐 조직인 것으로 알려져 있다. 특히 폐포 세척액은 검체의 획득이 폐 조직보다 쉬우며, *P. carinii*의 검출 예민도가 97%에 이르러 가장 좋은 검체로 인정되고 있다^{20,21)}. 본 연구의 대상 환자들 중의 경우 미만성 폐렴이 발생한 후 일차적으로 광범위 항균제를 투여하고 72시간동안 항균 치료에 대한 반응 여부 및 객담이나 기타 가검물의 배양 결과를 확인하여, 항균제에 대한 반응이 없고 일반 세균 배양 검사가 모두 음성인 경우 즉시 기관지 내시경을 시행하였다. 기관지

내시경으로 기관지 내의 병변 상태를 확인하고 동시에 15-20 ml 정도의 폐포 세척액을 채취하여 CFW 염색을 시행하였다. 대상 환자 10명 중 기관지 내시경으로 인한 합병증이나 다른 문제가 있었던례는 없었다.

본 연구를 통하여 얻을 수 있었던 또 하나의 중요한 결과는 PCP의 실제 발생 빈도에 대한 재고이다. PCP의 역학은 면역 억제 상태의 역학과 밀접한 연관이 있다. 즉, PCP는 숙주 방어 기전의 심각한 장애가 있기 전에는 발생하지 않는 질환이므로, *P. carinii*가 주위 환경에 매우 흔한 균이라도 정상 숙주에는 문제가 되지 않는다. 일반적으로 PCP는 전 세계적으로 비교적 균등하게 분포되어 있을 것으로 생각되고 있으나, 진단 방법의 문제점 등으로 구미 선진국 외의 나라에서 이의 발생 빈도가 보고된 적은 없다. AIDS가 생기기 전에는 이 질환은 백혈병이나 기타 항암 치료를 받는 환자에게 국한되어 발생하는 질환이었으며¹⁾, 임파관상계 악성종양 환자의 부검례에서 5%의 환자가 임상적으로 발현치 않은 PCP를 가지고 있었다는 보고도 있다²²⁾. AIDS의 창궐 이후에는 PCP의 발생 빈도는 AIDS의 발생 빈도와 일치하는 양상을 보이고 있다. 이 질환은 그동안 국내에서의 증명례가 많지 않은 탓에 상당히 드문 질환일 것으로 생각되어져 왔고, 실제 임상에서도 감별 진단의 우선 순위에서 중요시되지 않았던 것이 사실이었다. 그러나 본 연구가 진행된 1년 동안 임상상이나 방사선 소견으로 의심되고, CFW 염색으로 확인된 PCP가 4례에 이르러 이 질환의 국내 발생 빈도가 적지 않을 것임을 추정할 수 있었다. 이는 그동안 국내에서 PCP가 드문 질환일 것으로 생각하였던 것이 진단 방법 상의 난점 때문이었음을 재확인 하는 결과로 생각 된다.

이상과 같이 본 연구에서는 기저 면역기능이 저하되고 미만성 폐렴이 발생한 10명의 환자를 대상으로 CFW 염색을 시행한 바, 4명의 환자에서 PCP를 확진할 수 있었으며, 이에 대한 항균 요법으로 모두 완치 가능하였다. CFW 염색은 매우 간단하고 검사 시간이 아주 짧아, 향후 실제 임상에서 PCP의 확진에 아주 유용하게 사용될 수 있는 검사법임을 확인하였고 이러한 방법의 도입이 PCP 진단의 빈도를 더욱 높일 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Burke BA, Good RA: *Pneumocystis carinii* infection. *Medicine*. 52:23, 1973
- 2) Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, et al: *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States: Epidemiologic, clinical and diagnostic features. *Ann Intern Med* 80:83-93, 1974
- 3) Kovacs JA, Hiemenz JW, Macher AM, et al: *Pneumocystis carinii* pneumonia: A comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Ann Intern Med* 100:663-667, 1984
- 4) Walzer PD: *Diagnosis of pneumocystis carinii pneumonia*. *J Infect Dis* 157:629-632, 1988
- 5) Hopewell PC: *Pneumocystis carinii* pneumonia: An update. *Treatment of serious infections in the 1990s*. Sande MA (Ed) Churchill Livingstone 1992. pp 175-204
- 6) Mahan CT, Sale GE: *Rapid methenamine silver stain for pneumocystis carinii and fungi*. *Arch Pathol Lab Med* 102:351-352, 1978
- 7) Yu PKW, Uhl JR, Anhalt JP: *Rapid methenamine silver stain*. *Arch Pathol Lab Med* 113:111, 1989
- 8) Smith JW, Bartlett MS: *Diagnosis of pneumocystis pneumonia*. *Lab Med* 10:430-435, 1979
- 9) Ruskin J: *Parasitic diseases in the compromised host. in Clinical approach to infection in the compromised host*. 2nd Ed Rubin & Yound (Ed) Plenum Medical 1988 pp 253-304
- 10) Monheit JE, Cowan DF, Moore DG: *Rapid detection of fungi in tissues using Calcofluor white and fluorescence microscopy*. *Arch Pathol Lab Med* 108:616-618, 1984
- 11) Baselski VS, Robison MK, Pifer LW, Woods DR: *Rapid detection of Pneumocystis carinii in bronchoalveolar lavage samples by using Cellufour Staining*. *J Clin Microbiol* 28:393-394, 1990
- 12) Kim YK, Parulekar S, Yu PKW, Pisani RJ, Smith TF, Anhalt JP: *Evaluation of Calcofluor white stain for detection of pneumocystis carinii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 13:307-310, 1990
- 13) Walzer PD: *Pneumocystis carinii*. in *Principles and practices of infectious diseases*. 3rd Ed. Mandell (ed). Churchill Livingstone. 1990, pp2103-2110
- 14) Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al: *Ribosomal*

- RNA sequences shows *pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 334:519-522, 1988
- 15) Cushion MT, Ruffolo JM, Walzer PD: *Characterization of the developmental stages of pneumocystis by light microscopic techniques. Lab Invest* 58:324-331, 1988
 - 16) Gill VJ, Evans G, Stock F, Parrillo JE, Masur H, Kovacs JA: *Detection of Pneumocystis carinii by fluorescence-antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. J Clin Microbiol* 25: 1837-1840, 1985
 - 17) Kovacs JA, Gill V, Swan JC, Ognibene F, Shelhamer J, Parrillo JE, Masur M: *Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of pneumocystis carinii pneumonia. Lancet* 2:1-3, 1986
 - 18) Bigby T, Margolskee D, Curtis J, et al: *The usefulness of induced sputum in the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Respir Dis* 133:515-519, 1986
 - 19) O'Brien RF, Quinn JL, Myakara BT, et al: *Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia by induced sputum in a city with a moderate incidence of AIDS. Chest* 95:136-139, 1989
 - 20) Golden JA, Hollander H, Stulbarg Ma, Gamsu G: *Bronchoalveolar lavage as the exclusive diagnostic modality for Pneumocystis carinii pneumonia: A prospective study among patients with acquired immunodeficiency syndrome. Chest* 90:18-22, 1986
 - 21) Martin WJ, Smith TF, Sanderson DR, Burtinell WM, Cockeril FR, Douglas WW: *Role of bronchoalveolar lavage in the assessment of opportunistic pulmonary infections: Utility and complications. Mayo Clin Proc* 62:549-557, 1987
 - 22) Easterly JA: *Pneumocystis carinii in lungs of adults at autopsy. Am Rev Respir Dis* 94:935-937, 1968
-