

임상 검체에서 분리한 *Mycobacterium tuberculosis* Complex 중에서 *Mycobacterium tuberculosis*의 빈도

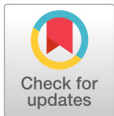
조현미¹, 김종배², 어영¹

¹연세대학교 원주의과대학 원주세브란스기독병원 진단검사의학과, ²연세대학교 원주캠퍼스 보건과학대학 임상병리학과

Frequency of *Mycobacterium tuberculosis* Among *M. tuberculosis* Complex Strains Isolated from Clinical Specimen

Hyunmi Cho¹, Jong-Bae Kim², Young Uh¹

¹Department of Laboratory Medicine, Wonju Severance Christian Hospital, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, ²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju, Korea



OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585
eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2020 March, 23(1): 21-31
<https://doi.org/10.5145/ACM.2020.23.1.21>

Corresponding author

Young Uh

E-mail: u931018@yonsei.ac.kr

Tel: +82-33-741-1592

Fax: +82-33-731-0506

Received: June 12, 2019

Revised: August 19, 2019

Accepted: August 19, 2019

© 2020 Korean Society of Clinical Microbiology.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

Background: Rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is of primary importance for infection control and selection of anti-tuberculosis drugs. However, most clinical laboratories report MTB complex (MTC) without reporting MTB because MTC comprising MTB, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* and *Mycobacterium pinnipedii* have 99.9% similarity at the nucleotide level and identical 16S rRNA sequences. This study was conducted to analyze the species frequency of MTC isolates obtained from clinical specimen.

Methods: Of 310 MTC isolates obtained from clinical samples in a tertiary care hospital from February 2017 to August 2018, MolecuTech Real TB-Taq (YD Diagnostics, Korea) real-time PCR was performed, specifically to detect MTB. For DNA showing MTB negative results by MTB-specific real-time PCR or pyrazinamide-resistant strains, PCR-based MTC typing, spoligotyping, and exact tandem repeat D gene sequencing were performed.

Results: All the 310 MTC isolates were identified to be MTB. Two MTB strains of East-African-Indian 4-Vietnam genotype, which have not been reported in Korea, were also found.

Conclusion: There was no zoonotic tuberculosis in this study. Since we investigated only 310 MTC isolates detected in only one medical institution, multi-center study is needed to accurately know the prevalence of zoonotic tuberculosis in Korea.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, Sequence analysis, Spoligotyping

INTRODUCTION

사람과 동물에게 결핵을 일으키는 병원체는 *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC)로서 계통학적으로 매우 유사하지만 특정 동물이 숙주이거나 특정 지역에서만 발견되는 특징이 있으며, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* 등이 포함되어 있다[1]. MTC가 일으키는 결핵의 임상 소견은 거의 비슷하지만 병원성, 발생 지역의 범위, 항결핵제에 대한 내성, 전염성, 숙주 선호도 등이 다르므로 MTC를 균종 수준에서 동정할 필요성이 있으나 MTC의 16S rRNA 서열이 동일하고 전체 유전자 염기서열 상동성이 99.9% 이상이므로 감별 동정하기가 쉽지 않다 [1,2]. 따라서, MTC에서 MTB를 감별할 수 없는 상품화 결핵균 동정용 분자진단법을 사용하는 검사실에서는 결핵균 동정 결과를 MTC로 보고할 수밖에 없고 임상에서는 MTC 양성이면 MTB에 의한 결핵 환자로 간주하여 항결핵제 치료를 하고 있는 실정이다.

결핵 퇴치 방안의 일환으로 인수공통결핵 (zoonotic tuberculosis)에 대한 관심이 증가하면서 인수공통결핵에 대한 정확한 역학 자료의 중요성이 크게 부각되고 있지만 국내에서는 MTC에 속한 미코박테리아의 종별 빈도에 대한 연구가 거의 없다. 이에 이번 연구에서는 임상 검체에서 검출된 MTC 중에서 *M. bovis*를 비롯한 다른 균종들의 비율 분석과 함께 MTC의 균종 구별에 유용한 진단 방법을 확인하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. MTC 검출을 위한 Advansure Mycobacterium Genoblot Assay

1-1. 연구 대상과 DNA 추출

2017년 2월부터 2018년 8월까지 하나의 상급종합요양병원에 결핵배양검사가 의뢰되어 BACTEC MGIT 액체배지(Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA) 또는 3% Ogawa 배지(Shinyang chemical, Seoul, Korea)에서 배양된 균에서 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 Ogawa 배지에서 자란 경우에는 접종 루프를 이용하여 1 루프를 떼어낸 후 200 μ L의 멸균 증류수가 들어 있는 1.5 mL 마이크로튜브에 잘 풀고 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 상청액을 제거하였다. MGIT 배지에서 자란 경우에는 액체배지 1 mL를 1.5 mL 마이크로튜브에 첨가한 후 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 전처리 과정 후 남아 있는 침전물에 멸균 증류수 1 mL를 첨가하여 강하게 섞은 후 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 상청액을 제거하였다. 각각의 튜브에 추출 완충 용액을 100 μ L씩 첨가한 후 100°C에서 20 분간 가열하고 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다.

본 연구는 연세대학교 원주세브란스기독병원의 연구심의위원회의 심의를 거친 후 연구를 진행하였다(IRB No. CR318323).

1-2. Advansure Mycobacterium Genoblot Assay

추출한 DNA는 MTC와 20여종의 nontuberculous mycobacteria를 구분할 수 있는 Advansure Mycobacterium Genoblot Assay (LG Chemistry, Seoul, Korea)를 사용하여 검사하였다[3]. PCR은 GeneAmp PCR system 9700 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 사용하여 50°C에서 2분, 95°C에

서 10분간 변성시킨 후 94°C 30초, 65°C 1분, 72°C 30초를 15회 반복하고 94°C 30초, 55°C 1분, 72°C 30초를 38회 반복한 다음 72°C 10분간 반응시켰다. Reverse hybridization line blot assay는 Advansure hybridizer (LG Chemistry)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 검사하였으며 발색 과정이 끝난 스트립은 밴드의 패턴을 자동으로 분석하는 장비인 Advansure GenoLine Scan (LG Chemistry)을 이용하여 분석하였다.

2. MTB 특이적인 real-time PCR

Advansure Mycobacterium Genoblot Assay (LG Chemistry)에서 MTC로 확인된 310균주를 대상으로 결핵균에만 특이적으로 존재하는 region of difference (RD) 부위를 표적으로 하여 MTB만을 검출하는 MolecuTech Real TB-Taq (YD diagnostics, Yongin, Korea) 제품을 이용하여 real-time PCR을 시행하였다. 검사 방법을 요약하면 제품에 제공된 master mix를 제조하여 추출한 DNA 5 µL를 PCR 튜브에 넣은 후 SLAN Real Time Detection System (LG chemistry)으로 real-time PCR을 실시하였다. Real-time PCR은 94°C 3분간 변성 후 94°C 20초, 55°C 40초 후 형광값을 측정하는 과정을 40회 반복하였다. Internal control (FAM)의 Ct 값이 30-35로 검출되고 MTB (HEX)에 대한 Ct 값이 35 이하이면 MTB 양성으로 판정하였고, internal control (FAM) Ct 값만 30-35로 검출되면 MTB 음성으로 판정하였다.

3. PCR 기반의 MTC typing

310 MTC 중에서 MTB가 아닐 가능성이 있는 균주를 선별하기 위하여 MTB를 특이적으로 검출하는 상품화된 PCR 검사를 시행한 후, 제한적으로 MTB 음성 결과를 보이는 균주와 pyrazinamide 내성인 균주에 대해서만 PCR-based MTC typing, spoligotyping를 시행하였고 염기서열분석법으로 exact tandem repeat를 분석하였다.

MTC를 구별하기 위하여 MTC 염색체 유전자 중 RD 결실 부위를 알아보기 위해 Rv0577, IS1561 (Rv3349c), Rv1510 (RD4), Rv1970 (RD7), Rv3877/8 (RD1), Rv3120 (RD12), Rv2073c (RD9) 부위에 특이적인 7쌍의 primer[4]를 선택하여 4종류의 reference DNA [MTB H37Rv (ATCC 25619), *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG (ATCC 19274), *M. africanum* (KCTC 9504)], 1종류의 소에서 분리된 *M. bovis* DNA와 pyrazinamide 내성인 MTC 7균주의 DNA를 이용하여 PCR을 시행하였다(Table 1).

Table 1. Primers used in PCR-based MTB complex typing

Primer type and target locus	Primer name	Nucleotide sequence (5' → 3')	Size, base pair
Rv0577	Rv0577F	ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA	786
	Rv0577R	CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA	
IS1561 (Rv3349c)	IS1561F	GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT	943
	IS1561R	AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA CCA TTG ACT	
Rv1510 (RD4)	Rv1510F	GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC	1,033
	Rv1510R	TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C	
Rv1970 (RD7)	Rv1970F	GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC	1,116
	Rv1970R	CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG	

Table 1. Primers used in PCR-based MTB complex typing (continued)

Primer type and target locus	Primer name	Nucleotide sequence (5' → 3')	Size, base pair
Rv3877/8 (RD1)	Rv3877/8F	CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC	999
	Rv3877/8R	CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C	
Rv3120 (RD12)	Rv3120F	GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT	404
	Rv3120R	GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T	
Rv2073c (RD9)	Rv2073cF	TCG CCG CTG CCA GAT GAG TC	600
	Rv2073cR	TTT GGG AGC CGC CGG TGG TGA TGA	

Abbreviation: MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; IS, insertion sequence; RD, region of difference.

PCR은 AccuPower Taq PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 10 pmol씩의 primer, 10 ng의 DNA를 넣어 총 20 μ L로 만든 후, GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분을 25회 반복하고 72°C 10분간 반응시켰다. PCR 증폭 산물은 2% 아가로오스 겔로 전기영동하여 Gel Doc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 이미지를 판독하였다.

4. Spoligotyping

Spoligotyping은 spoligotyping-strip (M&D Inc., Wonju, Korea) 제품을 사용하여 4종류의 reference DNA [MTB H37Rv (ATCC 25619), *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG (ATCC 19274), *M. africanum* (KCTC 9504)], 1종류의 소에서 분리된 DNA와 pyrazinamide 내성인 MTC 7균주의 DNA를 이용하여 검사하였다. Strip에는 MTB RD spacer region에 대한 biotin이 부착된 primer가 붙여져 있다(Table 2). PCR은 kit에 제공된 PCR premixture를 사용하여 추출한 DNA 3 μ L와 증류수 17 μ L를 넣은 후 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)를 사용하여 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초를 35회 반복하고 72°C 7분간 반응시켰다. 증폭된 DNA 산물은 spoligotyping strip I, II를 이용해 reverse blot hybridization assay 과정을 실시하였다. Spoligotyping 검사 과정은 증폭된 DNA 산물을 kit에서 제공한 변성 용액을 동량으로 섞은 후 실온에서 5분간 방치한 다음 kit에서 제공된 tray well에 spoligotyping strip I, II를 넣고 DNA 변성물과 혼성화 용액 1 mL를 잘 섞어 strip에 뿌린 후 60°C 항온수조에서 60 rpm으로 30분간 혼성화시켰다. Well 내의 용액을 모두 제거한 후 세척액 1 mL를 분주하고 60°C 항온수조에서 60 rpm으로 10분간 2회 세척 후 conjugate dilution solution 1 mL에 conjugate (alkaline phosphatase) 0.5 μ L를 희석하여 분주한 후 실온에서 60 rpm으로

Table 2. Primers used in spoligotyping and exact tandem repeat D sequencing

Primer type and target locus	Primer name	Nucleotide sequence (5' → 3')	Size, base pair
Spoligotyping			
DR	DRa	GGT TTT GGG TCT GAC GAC	Variable
	DRb	CCG AGA GGG GAC GGA AAC	
ETR-D sequencing			
ETR-D	ETRDF	GTT GAT CGA GGC CTA TCA CG	Variable
	ETRDR	GAA TAG GGC TTG GTC ACG TA	

Abbreviation: DR, direct repeat; ETRDF, exact tandem repeat D forward; ETRDR, exact tandem repeat D reverse.

30분간 반응시켰다. 2회 세척 후에 희석한 NBT/BCIP 용액(1:50)을 넣어 10분간 발색시켰다. 최종적으로 증류수로 2회 세척 후 strip을 건조시킨 다음 판독하였다.

판독 방법은 43개의 MTC의 direct repeat spacer region probe를 data sheet의 대조선에 맞추어 붙인 후 발색이 된 곳은 'n', 발색이 없는 곳은 'o'로 패턴을 표기하였다. 결과분석을 위해 데이터 패턴을 binary code와 octal code로 변환시킨 후 Institut Pasteur de la Guadeloupe의 The SITVIT Database website, SpolDB4와 <http://www.mbois.org>를 이용하여 shared international type (SIT) number와 계통을 분석하였다.

5. MTC exact tandem repeat D 염기서열분석

MTC의 tandem repeat의 다양성을 확인하기 위한 MTC에 특이적인 exact tandem repeat D (ETR-D) 분석을 염기서열분석법을 이용하여 검사하였다[5,6]. PCR은 ETR-D에 특이적인 primer (Table 2)를 사용하여 AccuPower Taq PCR Premix (BIONEER)에 10 pmol씩의 primer, 10 ng의 DNA를 넣어 총 20 μ L 용량으로 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)를 사용하여 95°C에서 3분간 변성시킨 후 95°C 30초, 60°C 20초, 72°C 30초를 35회 반복하고 72°C 3분간 반응시켰다.

PCR 증폭산물은 2% 아가로오스 겔로 전기영동하여 Gel Doc system (Bio-Rad)으로 이미지를 판독하였다. 염기서열분석을 위한 PCR은 Exo-SAP 2 μ L와 PCR 산물 4 μ L를 섞은 후 37°C 30분, 85°C 15분간 반응 시켜 정제한 PCR 산물을 희석하여 95°C에서 1분간 변성시킨 후 95°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분을 25회 반복하였다. Sequencing PCR 산물은 에탄올로 정제한 후 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)로 검사하였다.

RESULTS

1. MTC 검출을 위한 Advansure Mycobacterium Genoblot Assay

연구 기간에 Advansure Mycobacterium Genoblot Assay (LG Chemistry)에서 MTC로 보고된 결과 중 동일인에서 동일 결과를 보인 경우는 처음 결과만을 분석 대상으로 하였다. 310명 대상군의 연령 중간값은 71세로, 70세 이상이 51.6%였다. 성별은 남자가 58.7%, 여자가 41.3%였으며 호흡기 검체가 93.5%였다(Table 3).

Table 3. Characteristics of 310 *Mycobacterium tuberculosis* complex cases in clinical specimen

Variables	<i>M. tuberculosis</i> complex No. (%)
Age, years	
0-9	1 (0.3)
10-19	5 (1.6)
20-29	11 (3.6)
30-39	13 (4.2)
40-49	36 (11.6)
50-59	53 (17.1)
60-69	31 (10.0)
≥ 70	160 (51.6)

Table 3. Characteristics of 310 *Mycobacterium tuberculosis* complex cases in clinical specimen (continued)

Variables	<i>M. tuberculosis</i> complex No. (%)
Sex	
Male	182 (58.7)
Female	128 (41.3)
Specimen	
Sputum	141 (45.5)
Bronchial washing	140 (45.2)
Pleural fluid	9 (2.9)
Urine	3 (1.0)
Cerebrospinal fluid	2 (0.6)
Colon	2 (0.6)
Lymph node	2 (0.6)
Others	11 (3.6)
Pyrazinamide susceptibility	
Resistant	7 (2.3)
Susceptible	303 (97.7)

2. MTB 특이적인 real-time PCR

MolecuTech Real TB-Taq (YD diagnostics) 검사에서 MTC 310건 중 307건이 MTB 양성이었으며 3건이 MTB 음성으로 internal control (FAM)의 Ct 값만 30-35로 검출되었다. 표준 DNA로 검사했을 때 MTB H37Rv와 *M. bovis* AN5가 MTB 양성으로 판독되었으며, *M. bovis* BCG와 *M. africanum*은 MTB 음성으로 판독되었다.

3. PCR 기반의 MTC typing

PCR-based MTC typing 검사에서 MTB H37Rv는 Rv0577, IS1561 (Rv3349c), Rv1510 (RD4), Rv1970 (RD7), Rv3877/8 (RD1), Rv3120 (RD12)와 Rv2073c (RD9)에서 모두 양성으로 확인되었다. *M. bovis* AN5와 소에서 분리된 *M. bovis*는 Rv0577, IS1561와 RD1은 양성이었고 RD4, RD7, RD12와 RD9에서는 음성이었다. *M. bovis* BCG는 Rv0577와 IS1561에서 양성이었고 RD4, RD7, RD1, RD12와 RD9에서는 음성이었다. *M. africanum*는 Rv0577, IS1561, RD4, RD1와 RD12에서는 양성, RD7와 RD9에서는 음성이었다. MTB 특이적인 real-time PCR에서 MTB 음성이었던 3주와 pyrazinamide 내성인 MTC 7주 모두는 Rv0577, IS1561, RD4, RD7, RD1, RD12와 RD9에 양성인 MTB였다(Table 4).

DISCUSSION

2018년 World Health Organization (WHO)의 Global Tuberculosis Report (결핵보고서)에서는 *M. bovis*에 의한 인수공통결핵을 처음으로 관심 사업에 포함시켰다[7]. 이에 앞서 2017년에 WHO와 유엔(United Nations)이 공동으로 발표한 인수공통결핵 로드맵에서는 먼저 10가지 우선순위를 정하여 단계적인 사업을 지속하기로 하였는데 그 우선순위 중 첫 번째가 완전하고 정확한 데이터를 수집하고 보고하는 것이며 두 번째가 진단 방법을 향상시키는 것이다[8]. Müller 등[9]이 61개국의 자료를 바탕으로 연구한 인수공통결핵 발생 추정치 자료에 의하면 아프리카를 제외한 지역은 전체 결핵의 1.4% 미만 정도로 판단하고 있다. 또한, 우리나라가 속한 서태평양지역 국가 중에는 호주, 뉴질랜드와 중국 일부 지역의 3개국의 WHO 데이터만 존재하였는데 세 나라의 인수공통결핵 발생 추정치는 각각 0.2%, 2.7%와 0.2%였다[9]. WHO에서 수집한 인수공통결핵 데이터도 특정 지역에 국한되거나 특정 기간에만 이루어진 것들이 대부분이어서 많은 한계를 내포하고 있지만 국내에는 *M. bovis*에 의한 결핵 발생 빈도를 보고한 데이터 자체가 없다.

*M. bovis*에 의한 인체 결핵 감염은 감염된 가축의 생유를 살균처리하지 않고 섭취하였거나 덜 익힌 고기나 부산물을 먹거나 이를 이용한 가공식품 등을 먹었을 때 주로 감염되므로 *M. tuberculosis*에 비해 폐외결핵의 빈도가 높고 부위별 발생 빈도는 림프절, 비노기계, 뼈와 관절, 장과 복강 및 신경계의 순서이다[10]. 국내에서 보고된 *M. bovis*에 의한 감염은 2011년 베트남에서 이주한 여성의 농흥에서 발생한 사례 1건이 있다[11].

이번의 MTC 유전형 분석에서 *M. bovis*는 검출되지 않았는데 국내의 경우 우유의 저온 살균법 도입으로 *M. bovis*에 의한 인체 결핵 감염은 거의 없을 것으로 여겨졌으며 소결핵 근절 프로그램의 실행으로 결핵에 걸린 가축들을 조기에 발견하여 살처분하면서 축산업에 종사하는 사람들이 소결핵에 걸릴 위험성도 현저히 낮아졌을 것으로 생각되었다.

이번 조사에서 시행한 MTC에 속하는 균종의 감별법 중에서 MTB 특이적인 real-time PCR 제품은 검사 과정과 판독 방법이 가장 간편하였으나 위음성이 3개(0.97%)에서 있었으며, spoligotyping 검사에서 1개는 T1이었고 2개는 EAI4-VNM이었다. 이러한 위음성 결과는 real-time PCR 제품에서 표적으로 하는 MTB에 특이적인 RD 부위가 공개되지 않아 정확히 알 수 없으나 MTB 중에 RD 부위의 결실이 원인일 가능성이 있다. MTB 중 일부에서 RD9 결실이 보고된 바 있으며 특히 EAI lineage에서 RD9 결실이 관찰된 것과 연관이 있을 것으로 생각된다[12]. MTB 특이적인 real-time PCR 제품에서 위양성으로 확인된 *M. bovis* AN5는 다른 *M. bovis*와는 RD9 결실 패턴이 다르다는 보고가 있다[13]. Table 4의 RD9 primer를 이용한 PCR 결과에 의하면 MTB H37Rv에서만 RD9 양성 있었고 *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG, 소에서 분리한 *M. bovis*와 *M. africanum*에서는 RD9 음성이었으므로 RD9의 primer 설계가 중요함을 확인할 수 있었다.

Spacer oligonucleotide typing (spoligotyping)은 전통적인 방법보다 훨씬 더 강력하게 MTB와 *M. bovis*를 구별하는 방법으로 MTC의 direct repeat locus의 구조와 다형성을 확인함으로써 MTC 내의 균종 간 구분 및 결핵균의 유전형 구분이 가능하다[14,15]. 이번 연구에서 spoligotyping 검사법으로 EAI4-VNM sublineage 2개를 확인하였는데 국내에서는 보고된 적이 없는 유전형이었다. EAI4-VNM는 주로 베트남에서 발견되는 유전형으로 베트남에서 분리된 결핵균의 25.3-50.7%가 EAI4-VNM라고 보고된 바 있으며[16], 이번 연구에서 확인한 2개의 EAI4-VNM sublineage 유전형도 국

내에 거주하는 베트남인에서 검출되었다. 이번 연구를 통해 spoligotyping은 MTC 균종을 감별하는 데 가장 유용한 검사일 뿐만 아니라 MTB 유전형까지 알 수 있어 질병의 역학 조사에도 유용하게 이용될 수 있는 검사였다. 그러나 spoligotyping 패턴 분석에서 동일한 SIT (564)의 동일한 clade (EAI4-VNM)로 확인되었으나 ETR-D 분석에서는 서로 다른 반복 횟수를 보이는 경우가 있었다. 이러한 결과는 서로 다른 유전형의 균주임에도 spoligotyping에서는 같은 유전형으로 판독된 것이므로 결핵균의 유행 유전형의 확인과 전파 경로를 규명하는 데 spoligotyping 한 가지 검사만으로 확인하기에는 부족한 점이 있으므로 서로 다른 두 가지 이상의 검사를 함께 이용해야 할 것으로 생각되었다. 또한 spoligotyping은 검사 방법과 결과 분석 방법이 PCR법에 비해서 다소 번거롭고 시간이 오래 걸리는 단점이 있었다.

이번 연구에서는 하나의 의료기관에서 검출된 310개의 MTC를 대상으로 조사하였기 때문에 국내의 인수공통결핵 유행률을 정확히 파악하기 위해서는 향후 국내 다기관 연구가 필요하다고 생각되었다. 또한 임상검사실에서 MTC에 속하는 균종들을 간편하고 정확하게 구분할 수 있는 multiplex PCR이 개발되면 MTC의 균종별 분리 빈도를 실시간으로 파악하는 데 도움이 될 것으로 생각되었다.

요약

배경: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)의 신속하고 정확한 검출은 감염 관리와 항 결핵약 선택에 있어 가장 중요하다. 그러나 MTB, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*와 *Mycobacterium pinnipedii*를 포함하는 MTB complex (MTC)는 뉴클레오타이드 수준에서 99.9% 유사성을 가지며, 16S rRNA 서열이 동일하므로 대부분의 임상검사실에서는 MTB로 보고하지 않고 MTC로 보고한다. 이 연구의 목적은 임상 검체에서 MTC 분리균의 미코박테리아의 종별 빈도 분석이다.

방법: 2017년 2월부터 2018년 8월까지 상급종합요양병원의 임상 검체에서 분리된 MTC 310개를 대상으로 MTB를 특이적으로 검출하는 MolecuTech Real TB-Taq (YD 제약, 한국) 실시간 PCR 검사를 시행하였다. MTB 특이적인 실시간 PCR에서 음성이거나 피라진아미드 내성인 균주의 DNA에 대하여 PCR 기반 MTC 타이핑, spoligotyping과 exact tandem repeat-D 유전자 염기서열분석을 시행하였다.

결과: 310개의 모든 MTC 균주가 MTB로 확인되었다. 한국에서 보고되지 않은 EAI4-VNM (East-African-Indian 4-Vietnam) 유전자형인 MTB가 2주 발견되었다.

결론: 이 연구에서는 인수공통결핵이 발견되지 않았다. 본 연구는 한 의료기관에서 검출된 310개의 작은 수의 MTC를 조사했기 때문에 우리나라의 인수공통결핵의 유행률을 정확하게 파악하려면 다기관 연구가 필요하다.

REFERENCES

1. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 2014;97:S5-19.
2. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: An introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech* 2001;20:21–54.
3. Hwang S, Oh KJ, Jang IH, Uh Y, Yoon KJ, Kim HY, et al. Evaluation of the diagnostic performance of the AdvanSure TB/NTM real-time PCR kit for detection of mycobacteria. *Korean J Clin Microbiol* 2011;14:55-9.
4. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003;41:1637-50.
5. Djelouadji Z, Raoult D, Daffé M, Drancourt M. A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e253.
6. Coitinho C, Greif G, Robello C, van Ingen J, Rivas C. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by polymerase chain reaction of exact tandem repeat-D fragment from mycobacterial cultures. *Int J Mycobacteriol* 2012;1:146-8.
7. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva; WHO press, 2018.
8. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Organisation for Animal Health(OIE). Roadmap for zoonotic tuberculosis. Geneva; WHO press, 2017.
9. Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, Parsons SD, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 2013;19:899-908.
10. Dürr S, Müller B, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, van Helden PD, et al. Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2399.
11. Lim SK, Park JY, Park SD, Chang HK. Localized empyema due to *Mycobacterium bovis*. *Korean J Med* 2012;81:792-6.
12. Brown T, Nikolayevskyy V, Velji P, Drobniewski F. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes. *Emerg Infect Dis* 2010;16:272-80.
13. Das S, Das SC, Verma R. Occurrence of RD9 region and 500 bp fragment among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol* 2007;51:231-4.
14. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.
15. Azadi D, Motallebirad T, Ghaffari K, Shojaei H. Mycobacteriosis and tuberculosis: laboratory diagnosis. *Open Microbiol J* 2018;12:41-58.
16. Nguyen VA, Choisy M, Nguyen DH, Tran TH, Pham KL, Dinh PT, et al. High prevalence of Beijing and EAI4-VNM genotypes among *M. tuberculosis* isolates in northern Vietnam: sampling effect, rural and urban disparities. *PLoS One* 2012;7:e45553.

