

임상검체에서 High Performance Liquid Chromatography법을 이용한 Mycobacteria의 동정

정윤성¹, 이선호¹, 정의석¹, 장철훈², 김성률¹

울산대학교병원 진단검사의학교실¹, 부산대학교 의과대학 진단검사의학교실²

Identification of Mycobacteria using High Performance Liquid Chromatography in Clinical Specimens

Joseph Jeong¹, Seon Ho Lee¹, Ue-Suk Jeong¹, Chulhun L. Chang², Sung-Ryul Kim¹

Department of Laboratory Medicine¹, Ulsan University Hospital, Ulsan, Korea; Department of Laboratory Medicine², College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Background : As tuberculous and nontuberculous mycobacterial infections are increasing, it is very important to differentiate the mycobacterial species. High performance liquid chromatography (HPLC) method has been proven to be a useful technique for the identification of mycobacteria. The purpose of this study was to investigate the identification rate using HPLC and to know nontuberculous mycobacterial distribution in Ulsan University Hospital.

Method : Mycobacteria grew in 959 clinical specimens, which were analyzed by HPLC, and their distribution was reviewed by retrospective studies.

Results : The patterns of HPLC were divided into single, double, and triple cluster groups which consist of 9, 20, and 4 species of mycobacteria respectively. The identification rate of mycobacteria by HPLC was 98.9%, And the rate of nontuberculous mycobacteria in mycobacterial culture positive specimens was 12.2%.

Conclusion : HPLC is an excellent tool for mycobacterial identification. And the culture rate of nontuberculous mycobacteria in clinical specimens is increasing in Korea.

(Korean J Clin Microbiol 2004;7(2):148-155)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Nontuberculous mycobacteria, HPLC, Mycobacterial identification.

서 론

결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 비결핵 항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)에 의한 감염증의 증가 추세는 전 세계적으로 중요한 관심의 대상이 되고 있다. 후천성면역결핍증의 증가와 면역억제 요법의 일반화

에 따라 결핵균에 의한 감염증은 의미있게 증가하고 있으며[1-4], 최근에는 면역억제 환자 뿐만 아니라 정상 면역능을 가진 사람들도 결핵균 및 *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense* 및 *M. genavence* 등의 비결핵 항산균의 검출 빈도가 증가하고 있다[5-8].

현재까지 우리 나라의 대한결핵협회와 3차 의료기관을 포함한 대부분의 의료기관에서는 항산균의 균종 감별을 위해 전통적인 생화학법이나 중합효소연쇄반응법, 유전자소식자법 등을 많이 사용하고 있으나[4,9,10], 이 방법들은 동정에 오랜 시간이 걸리거나, 오염에 의한 위양성률이 높거나, 다양한 비결핵 항산균을 모두 검출할 수

접 수 일: 04/8/9 게재승인일: 04/8/23

교신저자: 김성률

(682-714) 울산광역시 동구 전하동 290-3

울산대학교병원 진단검사의학과

TEL: (052)250-7273 FAX: (052)250-8269

E-mail: joseph@uuh.ulsan.kr, 690519@hitel.net

없거나, 각 균종별로 검사를 시행해야 하는 단점들이 있다[11-14]. 반면 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)법은 결핵균 및 다양한 비결핵 항산균의 균종 특이적 mycolic acid의 분해 산물을 분석하여 동정하는 방법으로 위의 단점들을 보완한 정확한 방법으로 알려져 있다[15,16].

이에 본 연구에서는 mycobacteria 표준균주들을 이용한 HPLC법으로 임상검체에서 분리된 결핵균 및 다양한 비결핵 항산균을 동정하여 HPLC법의 동정률을 확인하고, 동정된 결핵균 및 다양한 비결핵 항산균의 분포를 확

인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2002년 1월부터 2003년 6월까지 18개월간 울산대학교 병원 진단검사의학과에 항산균 배양이 의뢰된 3,072명의 8,045검체 중 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 권고안에 따라 고체 배지인 3% 오가

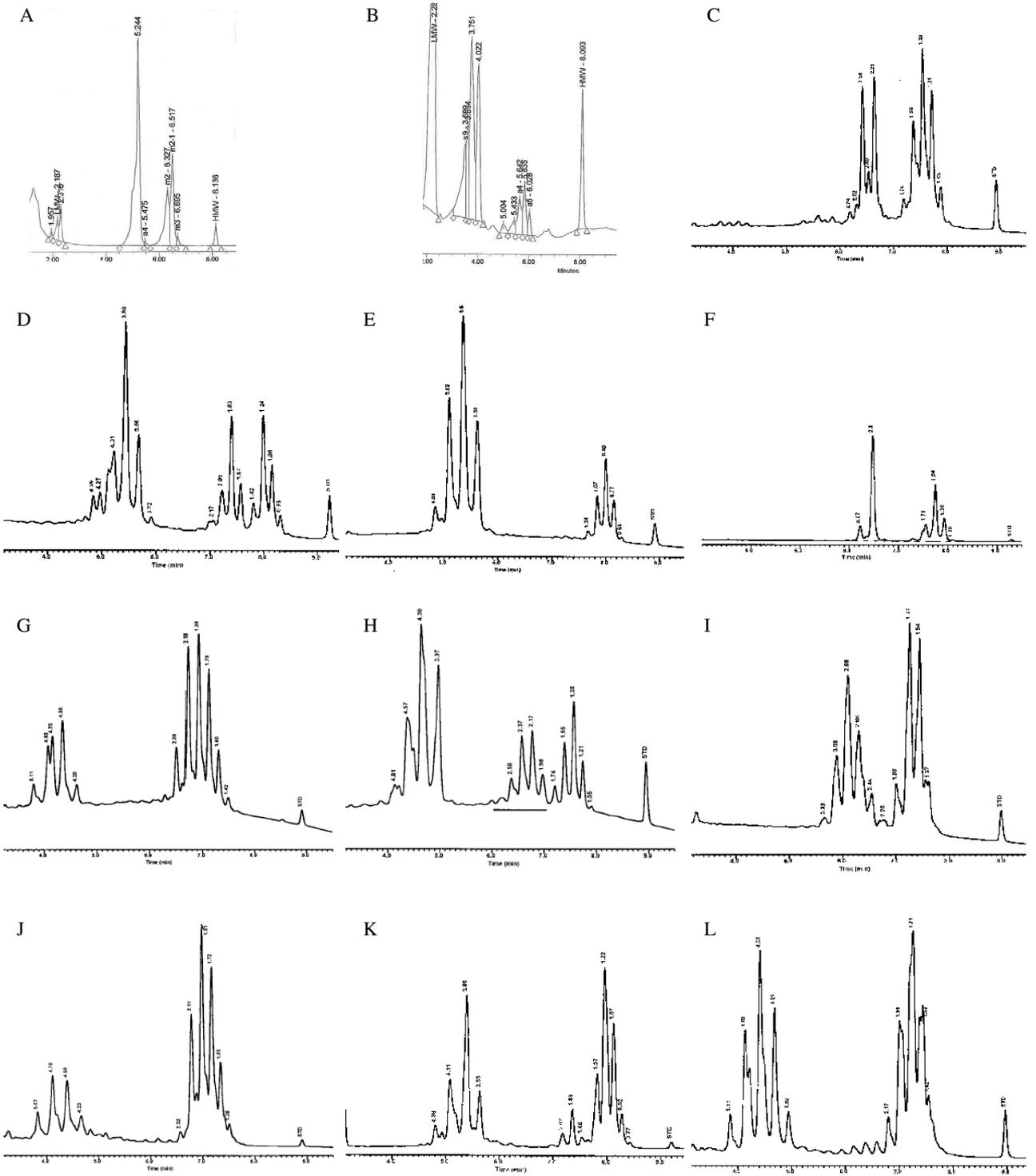
Table 1. Standard mycobacterial strains used in this study

<i>Mycobacterium</i> species	Description	<i>Mycobacterium</i> species	Description
<i>M. abscessus</i>	ATCC 19977	<i>M. marinum</i>	ATCC 927
<i>M. acapulcensis</i>	KTCC 9501	<i>M. mucogenicum</i>	ATCC 49650
<i>M. agri</i>	ATCC 27406	<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530
<i>M. asiaticum</i>	ATCC 25276	<i>M. peregrinum</i>	ATCC 14467
<i>M. austroafricanum</i>	ATCC 33464	<i>M. phlei</i>	ATCC 354
<i>M. avium</i>	ATCC 25291	<i>M. porcinum</i>	KTCC 9517
<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	<i>M. pulveris</i>	KTCC 9518
<i>M. celatum</i>	ATCC 51131	<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981
<i>M. chelonae</i>	ATCC 35752	<i>M. simiae</i>	ATCC 25275
<i>M. diernhoferi</i>	KTCC 9506	<i>M. smegmatis</i>	ATCC 21701
<i>M. flavescens</i>	ATCC 14474	<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 6841	<i>M. terrae</i>	ATCC 15755
<i>M. gastri</i>	ATCC 15754	<i>M. triviale</i>	ATCC 23292
<i>M. gilvum</i>	KTCC 9512	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 27294
<i>M. gordonae</i>	ATCC 14470	<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	<i>M. xenopi</i>	ATCC 19250
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478		

Table 2. Distribution of *M. tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria identified using HPLC from clinical specimens.

Specimen	<i>M. tuberculosis</i> (%)	<i>M. kansasii</i> (%)	<i>M. gordonae</i> (%)	<i>M. intracellulare</i> (%)	<i>M. avium</i> (%)	<i>M. abscessus</i> (%)	<i>M. peregrinum</i> (%)	<i>M. fortuitum</i> (%)	<i>M. marinum</i> (%)	NTM (%)	Total(%)
Sputum	772(80.5)	33(3.4)	20(2.1)	24(2.5)	9(0.9)	4(0.4)	2(0.2)	1(0.1)	1(0.1)	6(0.6)	872(90.0)
Bronchial aspiration	26(2.7)	-	1(0.1)	-	-	-	-	-	-	2(0.2)	29(3.0)
Urine	6(0.6)	-	10(1.0)	-	-	-	-	-	-	2(0.2)	18(1.9)
Pleural fluid	13(1.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13(1.4)
CSF	7(0.7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7(0.7)
Pus	4(0.4)	-	-	-	1(0.1)	-	-	-	-	1(0.1)	6(0.6)
Stool	4(0.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4(0.4)
Gastric aspiration	4(0.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4(0.4)
Bone marrow	3(0.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3(0.3)
Joint fluid	1(0.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(0.1)
Tissue	1(0.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(0.1)
Ascitic fluid	1(0.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(0.1)
Total	842(87.8)	33(3.4)	31(3.2)	24(2.5)	10(1.0)	4(0.4)	2(0.2)	1(0.1)	1(0.1)	11(1.2)	959(100)

Abbreviation: NTM, nontuberculous mycobacteria.



분석 과정은 먼저 methanolic potassium hydroxide나 열을 가하여 항산균 세포를 분해하여 비누화시키고, 지방산의 추출을 위해 산성화시키거나 클로로포름을 용매로 추출하였다. 추출한 성분을 potassium bicarbonate나 열을 가하여 기화시키고, 지방산의 파생물을 정제한 후 컬럼을 통과시켜 자외선 검출기로 HPLC 패턴을 검출하였다. 검출된 HPLC 패턴은 모두 저분자량과 고분자량 표준

물질의 peak들 사이에 나타난 특징적인 single, double, triple 및 multi cluster 패턴을 이용하여 네 그룹으로 분류하였고, 각 cluster 그룹에 속하는 균주는 각각의 cluster내의 peak 수, peak 유지 시간 및 peak 높이 비율을 기준으로 정도관리 균주들의 HPLC 패턴과 대조하여 최종 동정하였다. HPLC 패턴이 정도 관리 균주 33종의 어느 것보다도 일치하지 않는 경우 unclassified 비결핵 항산균으로 동정

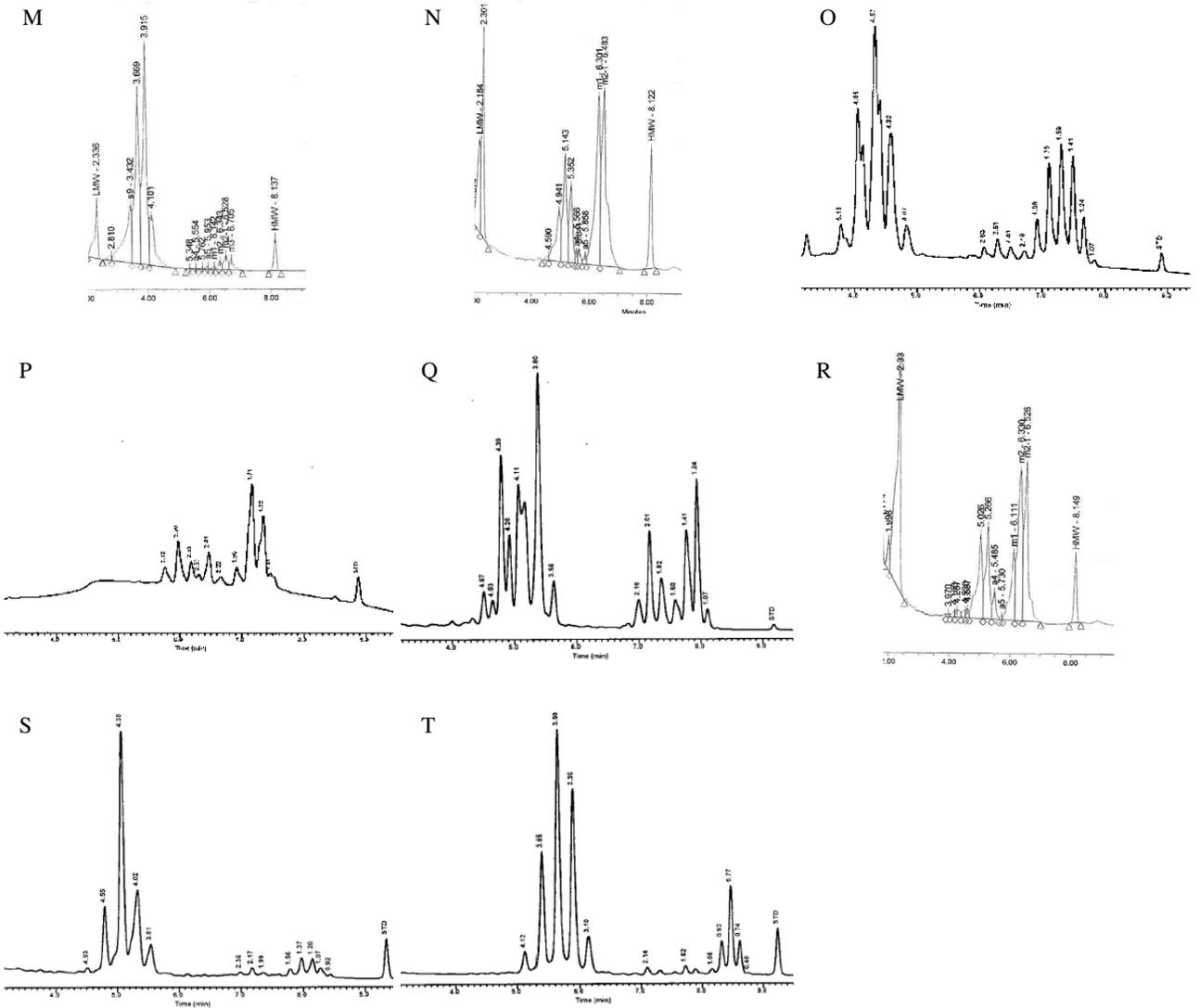


Fig. 2. Characteristic HPLC chromatograms of *Mycobacterium* species with double-cluster peak patterns. (A) *M. abscessus*; (B) *M. acapulcensis*; (C) *M. agri*; (D) *M. avium*; (E) *M. celatum*; (F) *M. chelonae*; (G) *M. diernhoferi*; (H) *M. flavescens*; (I) *M. fortuitum*; (J) *M. gilvum*; (K) *M. intracellulare*; (L) *M. mucogenicum*; (M) *M. nonchromogenicum*; (N) *M. peregrinum*; (O) *M. phlei*; (P) *M. porcinum*; (Q) *M. scrofulaceum*; (R) *M. smegmatis*; (S) *M. terrae*; (T) *M. xenopi*.

하였다.

결 과

1. 결핵균 및 비결핵 항산균의 HPLC 동정

항산균 표준균주 33 종 및 항산균 배양이 양성으로 확인된 959검체의 HPLC 패턴은 mycolic acid peak들이 모두 저분자량과 고분자량 표준 물질의 peak들 사이에 특징적인 single, double 및 triple cluster 양상을 보였다.

Single cluster 그룹에는 *M. asiaticum*, *M. bovis*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. trivi-*

ale 및 *M. tuberculosis* 등의 9종이 속하였다(Fig. 1). Double cluster 그룹에는 *M. abscessus*, *M. acapulcensis*, *M. agri*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. diernhoferi*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gilvum*, *M. intracellulare*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. porcinum*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, 및 *M. xenopi* 등의 20종이 포함되었다(Fig. 2). Triple cluster 그룹에는 *M. austroafricanum*, *M. pulveris*, *M. simiae* 및 *M. vaccae* 등의 4종이 포함되었다(Fig. 3). 각 cluster 그룹에 속하는 균주는 각각의 cluster내의 peak 수, peak 유지 시간 및 peak 높이 비율을 기준으로 정도관리 균주들의 HPLC 패턴과 대조하여 최종 동정하였다. 959검체 중에

이 포함되었고 이 분류에 의한 동정률은 98%라고 보고하였다. 또한 미국의 질병관리센터(CDC)에서는 결핵균을 포함한 20종의 항산균을 감별하기 위한 균종 특이적 mycolic acid의 HPLC 패턴의 표준안을 1996년과 1999년에 걸쳐 제시하였다[22-23].

본 연구에서는 33종의 항산균 표준 균주를 이용하여 HPLC 패턴과 대조하여 임상분리주의 균종을 동정하였으며, single cluster 그룹에는 *M. tuberculosis*를 포함한 9종이, double cluster 그룹에는 *M. avium*, *M. intracellulare* 등의 20종이, triple cluster 그룹에는 *M. austroafricanum* 등의 4종이 포함되었다. 네 개 이상의 peak cluster를 가지는 multi cluster 그룹은 현재까지 드물고, 병원성 유무가 확인되지 않은 그룹에 속해 있는데[15], 본 실험의 임상검체에서는 검출되지 않았다. 항산균 배양 양성으로 확인된 959검체 중에서 11검체를 제외한 948검체의 균종을 동정하여 98.9%의 동정 성공률을 보여 우수한 변별력을 확인할 수 있었다.

우리 나라에서의 비결핵 항산균의 검출 빈도는 정확히 알려져 있지 않은데, 1960년대의 비결핵 항산균의 빈도[24-27]는 배양 양성 검체중 1% 미만으로, 1970년 김[28] 등은 객담에서 분리한 비결핵 항산균은 2.7%로 보고하였다. 본 연구에서는 비결핵 항산균이 117건(72명)으로 배양 양성 검체의 12.2%로 나타나 70년대 이후 우리 나라에서도 비결핵 항산균의 검출율이 대단히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

또한 임상 검체에서 분리되는 항산균의 종별 빈도에 관한 보고는 많지 않은데, 1995년 대한결핵 및 호흡기학회에서 조사한 비결핵 항산균 전국 실태조사[4]에서는 1981년부터 1994년까지 14년간 총 158 검체의 비결핵 항산균을 동정한 결과 비결핵 항산균의 국내 분포 양상은 *M. avium-intracellulare* 104건(65.2%), *M. fortuitum* 20건(12.7%), *M. chelonae* 15건(9.5%), *M. gordonae* 7건(4.4%), *M. terrae* 5건(3.2%), *M. scrofulaceum* 3건(1.9%), *M. kansasii* 2건(1.3%), *M. szulgai* 2건(1.3%), *M. avium-intracellulare & terrae* 1건(0.6%) 이라고 보고하였다.

이에 반해 본 연구에서는 2002년 1월부터 2003년 6월까지 비교적 짧은 기간 동안에 울산 지역의 한 대학병원에서 검출된 비결핵 항산균이 117건으로 1981년부터 14년간 전국적으로 검출한 158건의 3/4에 육박하는 높은 검출율을 확인할 수 있었고, 균종 분포도 *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* 등은 상대적 감소 추세를, *M. kansasii*, *M. gordonae* 등은 상대적 증가 추세를 보이는데, 이는 미국의 질병관리센터에서 1993년부터 1996년까지 조사한 비결핵 항산균의 증감 추세[26]와 유사하다. 그러나 본 연구에서는 18개월의 짧은 기간 동안에 한 대학병원에서 검출된 비결핵 항산균 들만을 대상으로 조사하였기 때문에, 우리 나라의 전체적인 균종별 증감을 파악하기 위해서는 지속적이고 광범위한 조사가 필요할 것으로 판단된다.

이상의 결과로 HPLC법은 임상검체에서 mycobacteria의 동정에 98.9%의 변별력을 보여 우수한 동정법임을 확인하였다. 또한 HPLC법을 이용한 비결핵 항산균의 검출 빈도는 배양 양성 검체의 12.2%로 나타나 우리 나라에서도 비결핵 항산균의 검출율이 대단히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

요 약

배 경 : 결핵균 및 비결핵 항산균 감염증은 의미있게 증가하고 있으며, 비결핵 항산균의 경우 병원성 여부를 판단하기 힘들고, 효과적인 치료가 어렵기 때문에 항산균의 균종 감별은 대단히 중요하다. HPLC법은 결핵균 및 다양한 비결핵 항산균의 균종 특이적 mycolic acid의 분해 산물을 분석하여 동정하는 방법이다. 이에 본 연구에서는 표준균주를 이용한 HPLC법을 이용하여 임상검체에서 분리된 결핵균 및 다양한 비결핵 항산균을 동정하여 HPLC법의 동정 성공률을 확인하고, 다양한 비결핵 항산균의 분포를 확인하고자 하였다.

방 법 : 3% 오가와 배지와 액체 배지인 Mycobacterium Growth Indicator Tube의 두 배지 중 한 개 이상의 배지에서 항산균 배양 양성으로 확인된 959검체를 대상으로 HPLC법으로 검출한 패턴을 single, double, triple 및 multi cluster 패턴을 이용하여 네 그룹으로 분류하고, 각각의 cluster내의 peak 수, peak 유지 시간 및 peak 높이 비율을 기준으로 표준균주들의 HPLC 패턴과 대조하여 최종 동정하였다.

결 과 : HPLC 패턴은 single, double, 및 triple cluster 양상을 보였고 각각 9, 20, 및 4종이 포함되었다. 항산균 배양 양성인 959검체 중에서 11검체를 제외한 948검체를 동정하여 98.9%의 동정 성공률을 보였다. 비결핵 항산균은 배양 양성 검체의 12.2%였다.

결 론 : HPLC법은 임상검체에서 mycobacteria의 동정에 98.9%의 변별력을 보여 우수한 동정법임을 확인하였다. HPLC법을 이용한 비결핵 항산균의 검출 빈도는 배양 양성 검체의 12.2%로 나타나 우리 나라에서도 비결핵 항산균의 검출율이 대단히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Raviglione MC, Snider MC Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995;273:220-6.
2. World Health Organization. Strategic framework to decrease the burden of TB/HIV. 2002; WHO/CDS/TB/2002.296, WHO/HIV_AIDS/02.2.
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report. Geneva, Switzerland. 2002; WHO/CDS/TB/2002.295.

4. 대한결핵 및 호흡기학회 학술위원회. 비결핵항산균증 전국 실태조사. 결핵 및 호흡기질환 1995;42:277-94.
5. Falkinam JO III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996;9: 177-215.
6. Horsburgh CR Jr. *Mycobacterim avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1991;324:1332-8.
7. Hoffner SE. Pulmonary infections caused by less frequently encountered slow-growing environmental mycobacteria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:937-41.
8. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM. Infection with *Mycobacterim avium* complex in patients without predisposing conditions. N Engl J Med 1989;321:863-8.
9. 김호중, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철. Polymerase Chain Reaction (PCR)을 이용한 결핵의 진단에 관한 연구. 결핵및호흡기질환 1992;39:517-25.
10. 나준, 허정원, 이성희, 김봉철, 고윤석, 배직현. Gene Probe 법에 의한 *Mycobacterium tuberculosis* complex의 동정. 대한임상병리학회지 1997;17:71-8.
11. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994;32:277-84.
12. Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. N Engl J Med 1993; 329:2036.
13. Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. J Clin Microbiol 1994;32: 2995-98.
14. 김성률, 신정환, 정윤성, 이선호, 장철훈, 손한철. 비호흡기 검체에서 결핵균의 검출을 위한 Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test의 임상적 유용성. 대한임상병리학회지 1999;19:315-9.
15. Butler WR and Guthertz LS. Mycolic acid analysis by High-Performance Liquid Chromatography for identification of *Mycobacterium* species. Clin Microbiol Rev 2001;14:704-26.
16. Butler WR, Jost KC, Kilburn JO. Identification of Mycobacteria by High-Performance Liquid Chromatography. J Clin Microbiol 1991;29:2468-72.
17. Morri T. Atypical mycobacteriosis. Nippon Rinsho 2001; 59: (suppl7) 197-204.
18. Holdiness MR. Atypical mycobacterial infections. J La State Med Soc 1990;142:31-8.
19. Kruger M. Atypical mycobacterium infections. Derm Beruf Umwelt 1990;38:109-17.
20. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis 1979;119:107-59.
21. Wallace RJ Jr, O'Brien R, Glassroth J, Raleigh J, Dutt A. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1990;142: 940-53.
22. Butler WR, Floyd MM, Silcox V, Cage G, Desmond E, Duffey PS, et al. Mycolic acid pattern standards for HPLC identification of mycobacteria. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga 1999.
23. Butler WR, Floyd MM, Silcox V, Cage G, Desmond E, Duffey PS, et al. Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga 1996.
24. 김경수, 신용달, 안재원. Unclassified Mycobacteria의 역학적 연구. 결핵 및 호흡기질환 1966;25:5.
25. 이성관 및 신용달. 비정형항산균 감염의 역학적 연구. 결핵 및 호흡기질환 1967;28:1.
26. Centers for Disease Control and Prevention. Nontuberculous mycobacteria reported to the public health laboratory information system by state public health laboratories United States, 1993-1996. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga 1999.
27. 류우진, 안동일, 윤영자, 조정섭, 권동원, 김상재 등. 비결핵마이코 박테리움증의 임상 경험. 결핵 및 호흡기질환 1992;39:425-432.
28. 김성진 및 김상재. 객담에서 분리된 미분류항산균에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 1970;17:33-42.