

Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteria by PCR Assay

Seong Deok Lee¹, Hye Young Lee², Hyun Chul Kim², Soo Young Kim¹

¹Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, St. Vincent's Hospital, Suwon;

²Department of Biomedical Life Science, the Graduate School of Health and Environment, Yonsei University, Seoul, Korea

Background: The purpose of this study was to evaluate the usefulness of direct PCR for a rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), the differentiation of MTB from nontuberculous mycobacteria (NTM), and the identification of NTM species in acid-fast bacilli (AFB) smear-positive specimens.

Methods: A total of 255 AFB smear-positive respiratory specimens were studied. For the differentiation of MTB from NTM, the bands of the 360 bp, which exists both in MTB and NTM, and the 190 bp, which exists only in MTB, were amplified using the one-tube nested PCR targeting regions of the *rpoB* gene. The two-tube nested PCR targeting 16S-23S rRNA spacer gene was done with 34 specimens that were negative by one-tube nested PCR. The specimens that were tested positive for NTMs were subsequently subjected to PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis based on the *rpoB*

gene for mycobacterial species identification.

Results: Detection rate of MTB and NTM was 87% after the one-tube nested PCR. The detection range of MTB and NTM increased up to 93% after the two-tube nested PCR. The results of PCR-RFLP analysis identified those NTMs as *M. avium* and *M. intracellulare*.

Conclusion: This result seems to suggest strongly that the PCR testing especially aiming for differentiation of MTB from NTM, and identification of mycobacterial species using AFB smear-positive specimens would be highly important in clinical settings for effective treatment of patients. (Korean J Clin Microbiol 2007;10:135-142)

Key Words: MTB, NTM, Acid-Fast Bacilli, PCR, PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

서 론

현재 전세계 인구의 약 1/3 정도가 결핵균에 감염되어 있으며, 매년 약 3백만 명의 인구가 결핵으로 인해 사망하고[1], 또 다른 약 8백만의 새로운 환자가 발생하는 것으로 추정되고 있다[2,3]. 이러한 결핵의 가장 확실한 진단 방법은 결핵균에 의한 감염을 증명하는 것으로, 임상검체에서 결핵균을 검출하는 것이다[4,5].

우리나라의 결핵 환자 진단 기준은 임상검체의 도말 검사 결과에서 항산균이 증명된 경우, 또는 결핵균이 분리 배양된 경우 중 하나만 충족하여도 결핵 환자로 진단하고 세균학적 검사에서 결핵균을 증명하지 못할 경우에 한하여 임상적, 방사선학적 또는 조직학적으로 결핵에 합당한 증상이나 소견이 있어서 진료의사가 결핵 치료를 시행하기로 결정한 경우에는 의사환

자로 진단할 수 있도록 정해져 있다[5].

PCR 검사는 도말검사나 배양검사에서 구분하지 못하고 배제되었던 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)과 비정형 결핵균(nontuberculous mycobacteria, NTM)을 구분할 수 있다는 장점이 있어 미국에서는 객담 항산균 도말검사에서 양성을 보인 경우에는 핵산증폭검사(nucleic acid amplification test)를 시행하여 이 검사에서 양성을 보일 때는 폐결핵으로 잠정 진단하고, 음성을 보일 때는 NTM에 감염된 것으로 잠정진단 후 최종 진단은 배양결과를 가지고 판단하도록 권장하고 있다[6].

1980년대 이후 미국과 유럽, 일본에서 후천성 면역결핍증 등 면역기능 저하 환자에서의 파종성 감염과 함께 기저질환이 없는 정상 면역상태인 성인에서 NTM 폐질환의 발생이 증가하면서 최근 많은 관심을 모으고 있다[9-11]. NTM 감염증은 폐질환, 림프절염, 피부질환, 파종성 질환 등 네 가지 특징적인 임상 증후군으로 분류되며 이 중 폐질환은 NTM 감염증의 90% 이상을 차지하는 가장 흔한 형태이다[7,8].

국내에서는 과거부터 NTM은 대부분 오염 또는 집락형성으로 간주하였고 따라서 임상적 의미를 별로 부여하지 않았다[12]. 그러나 국내에서도 NTM이 증가하고 있으며[13], 최근 한

Received 16 August, 2006, Accepted 12 March, 2007
Correspondence: Seong Deok Lee, Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, St. Vincent's Hospital, 93-6, Ji-dong, Paldal-gu, Suwon 442-723, Korea. (Tel) 82-31-249-7647, (Fax) 82-31-244-6786, (E-mail) start2033@paran.com

연구에서 항산균 도말 양성, 배양 양성 검체의 10.3%가 NTM으로 보고되기도 하였다[14].

본 연구에서는 항산균 도말 양성 검체에 대하여 PCR을 시행하여 MTB와 NTM의 감별을 시도하고 PCR 방법 차이에 의한 MTB 및 NTM의 검출율을 비교하는 한편 검출된 NTM의 동정을 시도하여 어떤 종류의 NTM이 임상검체로부터 분리되는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 검체

2005년 6월 23일부터 2006년 2월 9일까지 수원시 소재의 한 대학병원에서 항산성 염색 결과 trace 이상으로 판독된 255개의 객담 검체를 사용하였다.

2. DNA 추출

PCR 실험을 위해 가열과쇄 유전자 추출법(bead beating)을 사용하였다. 항산성 염색을 위하여 원심분리하고 남은 약 500 μ L 이하의 객담을 1,500 μ L용 microcentrifuge tube에 넣고 증류수 1,000 μ L를 가해 약 5,000 g에서 5분간 2회 수세하고 침전물에 증류수 100 μ L를 넣고 100°C 끓는 물에서 10분간 방치 후 다음 단계로 넘어가기 전까지 동결시켜 보관하였다. 해동한 후 glass bead (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA) 150 μ L를 넣어 Bead beater (Biospec procects, OK, USA)로 medium speed, 90 초, 2회 파쇄한 후, 100°C에서 10분간 끓인 후 10,000 g, 1분간 원심 분리하였다.

3. PCR

1) 결핵균과 비정형 결핵균 구분을 위한 one-tube nested PCR: Mycobacteria가 공통적으로 가지고 있는 *rpoB* 유전자의 360 bp 부분과 결핵균만 가지고 있는 190 bp 부분을 이용하여 MTB와 NTM을 구분하기 위하여 one-tube nested PCR을 시행하였다. 마이코박테륨 균종들의 *rpoB* 유전자의 360 bp 부분을 증폭하기 위해 시발체로 5' TCA AGG AGA AGC GCT ACG A 3'와 5' GCA GAC CCT GAT CAA CAT CC 3'를 사용하였다[15]. 증폭된 유전자 부위는 *M. tuberculosis* (GenBank accession No. P47766) 서열 순서 902에서 1,261, codon 302에서 420이다. 동시에 *M. tuberculosis*에만 있는 190 bp 부분을 증폭하기 위한 시발체로는 IS6110부위의 5' GGC ATC GAG GTG GCC AGA TG 3'와 5' CAT AGG TGA GGT CTG CTA CCC 3'를 사용하였다. PCR 반응액은 AccuPower[®] PCR premix (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 사용하였고, genomic DNA 10 μ L와 시발체 각각 1 μ L, 멸균증류수 36 μ L를 혼합하여 최종 부피가 50 μ L가 되도록 하였으며, GeneAmp PCR system 2700 (Perkin-Elmer Cetus, Boston, MA, USA)를 사용하였다. PCR방

법은 다음과 같다. Pre-denaturation 과정으로 94°C에서 5분 반응 후, denaturation 과정 94°C 30초와 annealing/elongation 과정 72°C 1분을 15회 시행하여 190 bp를 증폭하였으며, 계속해서 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초 과정을 35회 시행하고 최종 72°C에서 7분간 실시하여 360 bp의 PCR 산물을 증폭하였다. 매 검사 때마다 양성 대조군으로는 *M. tuberculosis* H37Rv, NTM으로는 *M. smegmatis*를 사용하였으며, 음성 대조군에는 멸균증류수를 사용하였다. PCR 이후에는 1.5% (w/v) TBE agarose gel (Bioneer Co., Daejeon, Korea)과 0.5 \times TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 조성된 agarose gel 위에 PCR DNA size marker 10 μ L와 PCR 산물 5 μ L를 각각 점적하여 100 V에서 20분간 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 ethidium bromide (EtBr)로 10분 염색, 수돗물로 10분 탈색 후 UV transilluminator (Vilber Louramat, Mame La Valle, France)를 이용하여 전기영동 결과를 확인하였다.

2) 결핵균 확인을 위한 two-tube nested PCR

(1) First PCR: 마이코박테륨의 세균수가 적은 검체로부터 유전자를 증폭할 경우에는 one-tube nested PCR로는 검출이 용이하지 않은 경우가 있다. 여기서는 이러한 부분을 보완할 수 있는 방법으로 two-tube nested PCR을 시행하였다. MTB의 16S-23S rDNA intergenic spacer region만을 증폭하기 위한 시발체로 5' GGG GCG TAG GCC GTG AGG GGT TCT T 3'와 5' ATT GCA CAA AGA ACA CGC CAC CGC TG CC 3'를 사용하였다. PCR 반응액은 AccuPower[®] PCR premix를 사용하였고, genomic DNA 5 μ L, 시발체 각 1 μ L, internal control DNA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 3 μ L 및 멸균증류수 10 μ L를 넣어 최종 부피가 20 μ L가 되게 하여, PCR 과정은 pre-denaturation 94°C 5분 1 cycle, denaturation 94°C 30초, annealing 68°C 30초, elongation 72°C 30초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72°C 7분 1 cycle을 시행하였다.

(2) Second PCR: PCR 반응액은 앞서 기술한 AccuPower[®] PCR premix를 사용하여 1차 증폭산물 2 μ L, 5' CTT GTC TGT AGT GGG CGA GA 3'와 5' TAG CCG GCA GCG TAT CCA TT 3'의 염기서열을 갖는 nested PCR용 시발체를 각각 1 μ L씩 첨가하였고 멸균증류수 16 μ L를 넣어 최종 부피가 20 μ L가 되게 하였다. PCR 과정은 pre-denaturation 과정을 94°C에서 1 cycle, denaturation 과정을 94°C에서 30초, annealing 과정을 72°C에서 30초, elongation 과정을 72°C에서 30초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72°C 7분 1 cycle을 수행하였다. 이하 전기영동 및 염색 그리고 결과 확인은 앞서 기술한 것과 동일하게 시행하였다.

3) 항산균 동정을 위한 PCR: 앞서 기술한 *rpoB* 유전자 360 bp를 증폭하기 위해 앞서 사용한 시발체를 사용하였으며 genomic DNA 10 μ L, 멸균증류수 40 μ L를 넣고 최종 부피가 50 μ L가 되게 만들었다. PCR 과정은 pre-denaturation 과정을

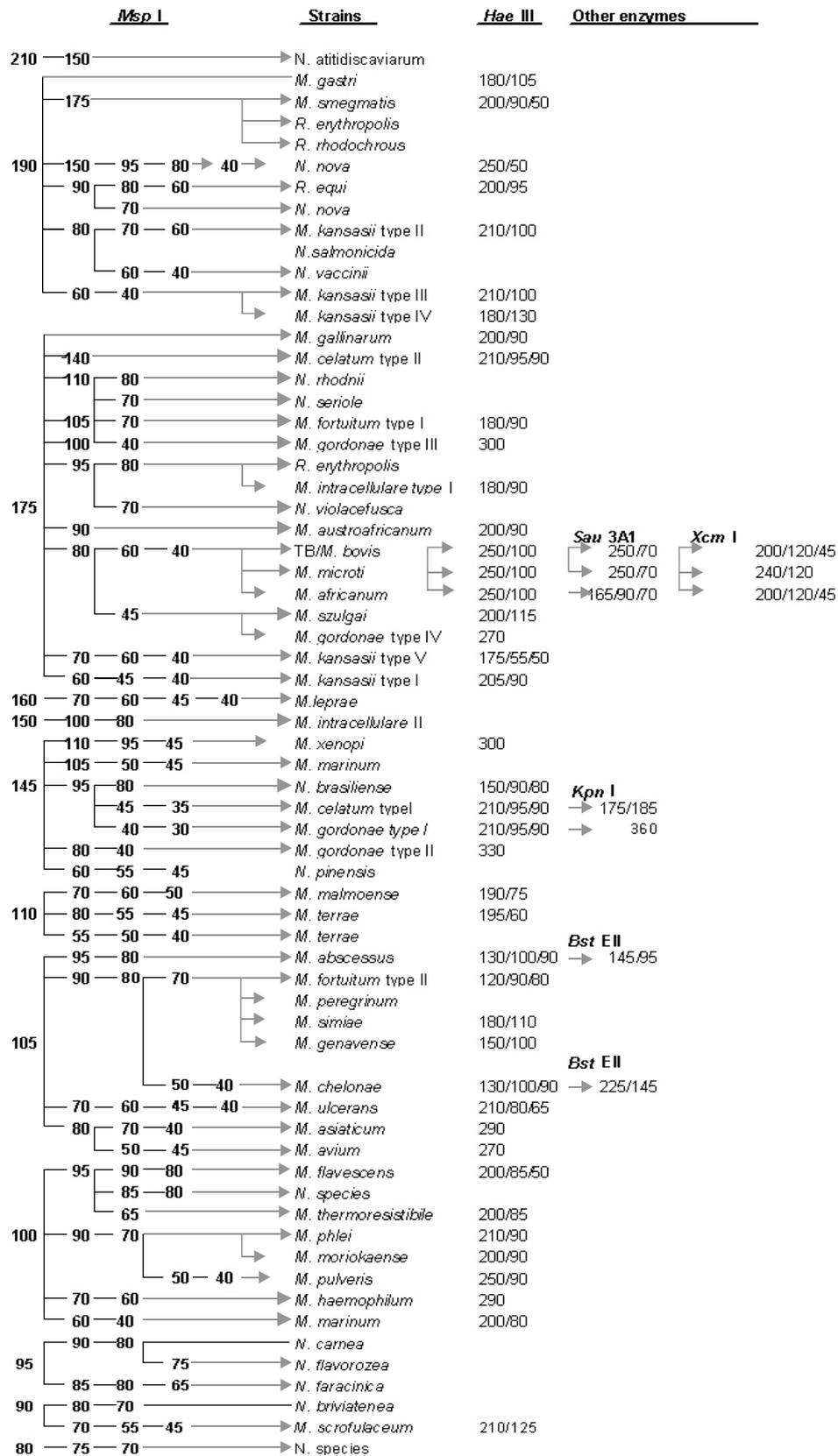


Fig. 1. Algorithm for mycobacterial identification.

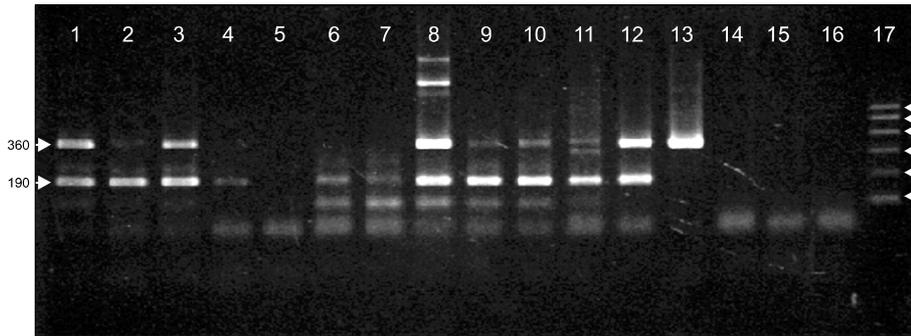


Fig. 2. PCR amplification of clinical isolates using one-tube nested PCR for detection of *M. tuberculosis* and NTM. Amplified MTB size is 190 bp and amplified NTM size is 360 bp. Lane 1~11, clinical isolates; lane 12, MTB control; lane 13, NTM control; lane 14~16, negative controls; lane 17, PCR size marker.

94°C에서 5분간 1 cycle, denaturation 과정을 94°C에서 20초간, annealing 과정을 58°C에서 20초간, elongation 과정을 72°C에서 30 초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72°C 10분 1 cycle로 수행하였다. PCR 산물이 약하거나 증폭되지 않은 경우나 비특이적 밴드가 나타난 경우에는 별도로 다음의 PCR을 시행하였다. 시발체 sequence의 길이를 늘려 5' TCA AGG AGA AGC GCT ACG ACC T 3'와 5' GCC GCA GAC CCT GAT CAA CAT CC 3' 되는 10 pmole nested PCR용 시발체 각각 1 µL, 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate 2 µL, 10x *Taq* buffer 5 µL, *Taq* polymerase (5U/µL) 0.5 µL, PCR products 2 µL, 멸균증류수 39.5 µL를 넣어 최종 부피가 50 µL가 되게 하였다. PCR 과정은 pre-denaturation 94°C 5분 1 cycle, denaturation 94°C 30초, annealing 72°C 30초, elongation 72°C 30초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72°C 10분 1 cycle로 수행하였다.

4. PCR-RFLP

One-tube nested PCR 및 two-tube nested PCR 실험에 의하여 NTM, 음성 및 저해제의 존재를 알 수 있었던 23 검체에 대하여 PCR-RFLP를 시행하였다. 마이코박테륨 분류를 위하여 성공적으로 증폭된 *rpoB* 360 bp PCR 산물 15 µL에 *Msp* I (Boehringer Mannheim Biochemicals, Germany) 0.5 µL (10U/µL), 10x *Msp* I buffer 2 µL, 멸균된 증류수 2.5 µL를 넣어 20 µL의 혼합물을 잘 섞어주고, 10,000 g에서 3~5초간 원심하였다. 37°C 항온수조에서 90분간 반응한 후 PRA (PCR-RFLP assay) size marker와 각 효소 반응액(10 µL)을 4% Metaphor TBE agarose gel (FMC, Bioproducts, Maine)에 점적한 후 100 V에서 60~75분간 전기영동 탱크에 얼음을 담아 전기 영동하였다. Gel을 EtBr로 염색한 후 UV transilluminator로 분절편을 확인하였다. 결과 판독은 마이코박테륨 동정 알고리즘(Fig. 1)을 참고하여 균을 동정하였다[15].

Table 1. Detection rate of *M. tuberculosis* and NTM from the acid fast smear-positive specimens using one-tube nested PCR

AFB	No. of sample	MTB	NTM	Negative	D/R (%)
±	56	42	3	11	80.4
1+	116	95	2	19	83.6
2+	66	62	-	4	93.9
3+	17	17	-	-	100
Total	255	216	5	34	86.7

Abbreviation: D/R, detection rate.

결 과

1. 항산성 염색과 one-tube nested PCR의 비교

MTB는 360 bp와 190 bp의 두 개, 혹은 190 bp 밴드를 나타내는 데 비하여 NTM은 360 bp의 한 개 밴드만을 보이게 되어 구별이 가능하였다(Fig. 2). 항산성 염색 결과가 trace인 56 검체로 PCR을 시행한 결과 MTB가 42, NTM이 3, 음성이 11검체 이었고, 항산성 염색 결과가 1+인 116 검체 중 MTB가 95, NTM이 2, 음성이 19검체였으며 또한, 항산성 염색 결과가 2+인 66 검체 중 MTB가 62, 음성이 4검체였다. 항산성 염색 결과가 3+인 17검체는 모두 MTB로 검출되었다(Table 1).

2. 항산성 염색과 two-tube nested PCR의 비교

Two-tube nested PCR의 대상을 one-tube nested PCR 결과 음성으로 판독된 검체를 대상으로 하였다. PCR 반응에서 16S-23S rRNA intergenic 부위를 1차(500 bp) 및 2차(185 bp) 증폭 하였으며 PCR 반응을 저해하는 저해제의 존재 여부도 500 bp 상당하는 부분의 분획 유무에 따라 판단할 수 있었다(Fig. 3). 그 결과 항산성 염색 trace인 11 검체 중 MTB가 4, 음성이 6, 항산성 염색 결과가 1+ 19 검체 중에서 MTB가 9, 음성이 5검체에서 확인되었으며, 항산성 염색 결과가 2+인 4 검체 중 MTB가 3검체에서 확인되었다(Table 2). 이 중 inhibitor가 발견된 검체는 항산성 염색 trace에서 1, 항산성 염색 1+인 검체에

서 5, 항산성 염색 2+인 1개의 검체에서 발견되었다.

3. 항산성 염색과 one-tube nested PCR 및 two-tube nested PCR의 비교

항산성 염색 결과가 trace 이상인 결과를 가진 검체에 대해 PCR 방법과의 비교를 위해 one-tube nested PCR 및 two-tube nested PCR을 시행한 결과 MTB, NTM 및 음성의 결과로 좀 더 세분화 된 결과를 얻을 수 있었다. one-tube nested PCR에서

는 MTB와 NTM의 구별을, two-tube nested PCR에서는 MTB의 존재여부를 구분하여 이 둘을 종합하여 결과를 확인할 수 있었다(Table 3). 항산성 염색 결과가 trace인 56 검체 중 MTB가 46, NTM이 3, negative가 7검체에서 확인되었으며, 항산성 염색 결과가 1+인 116 검체 중에서 MTB가 104, NTM이 2, negative가 10검체에서 확인되었다. 또한, 항산성 염색 결과가 2+인 66 검체 중 MTB가 65, negative가 1검체에서 확인되었고, 항산성 염색 결과가 3+인 17검체는 모두 MTB로 검출되었다.

Table 2. Detection rate of *M. tuberculosis* using two-tube nested PCR from the AFB smear-positive specimens that were not detected by one-tube nested PCR

AFB	No. of sample	MTB	Inhibitor	Negative
±	11	4	1	6
1+	19	9	5	5
2+	4	3	1	-
Total	34	16	7	11

Table 3. Detection rate of *M. tuberculosis* using combined one-tube and two-tube nested PCR

AFB	No. of sample	MTB	NTM	Negative	D/R (%)
±	56	46	3	7	87.5
1+	116	104	2	10	91.4
2+	66	65	-	1	98.5
3+	17	17	-	-	100
Total	255	232	5	18	93.0

Abbreviation: D/R, detection rate.

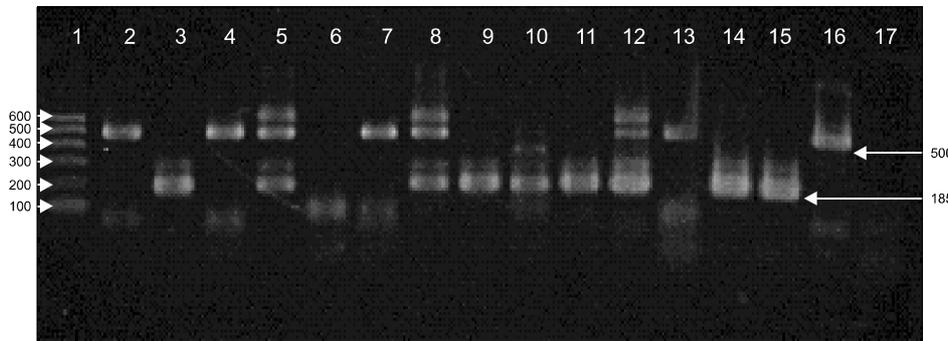


Fig. 3. PCR amplification of clinical isolates using two-tube nested PCR for detection of *M. tuberculosis*. Amplified MTB size is 185 bp and amplified internal control size is 500 bp. Lane 1, PCR size marker; lane 2 ~14, clinical isolates; lane 15, MTB control; lane 16, NTM control; lane 17, negative control.

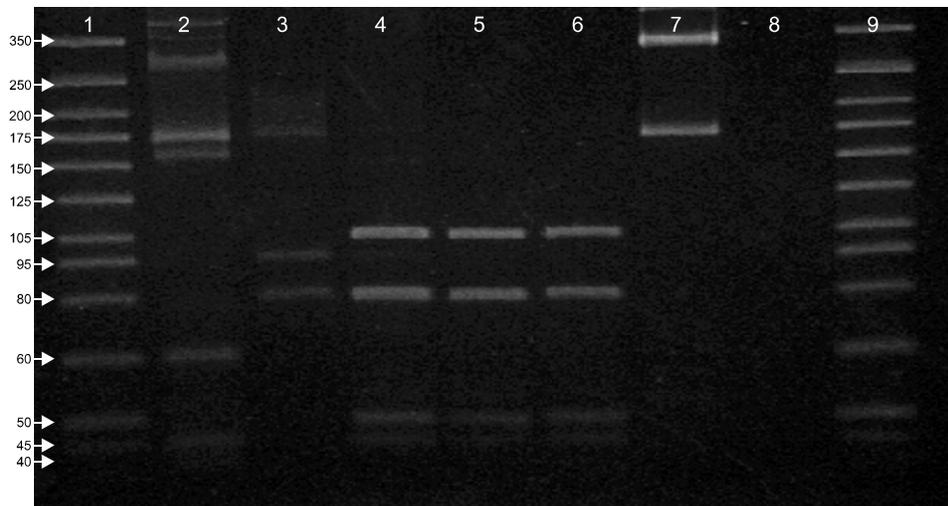


Fig. 4. PCR-RFLP analysis for identification of mycobacterial clinical isolates. Lane 1, 9, PCR size marker; lane 2, unidentified; lane 3, *M. intracellulare*; lane 4, *M. avium*; lane 5, *M. avium*; lane 6, *M. avium*; lane 7, positive control; lane 8, negative control.

이상의 결과에서 총 항산성 염색 trace 이상 결과를 나타내는 255 검체에서 MTB가 232검체에서 확인되었으며, NTM이 5검체에서 확인되었다. 또한, negative가 18검체에서 확인되었다.

4. PCR-RFLP를 이용한 마이코박테륨의 동정

rpoB gene의 360 bp 부분을 확인할 수 있었고, 여기에 *Msp* I 을 첨가하여 동정결과를 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그 결과 4 검체에서 positive, 1 검체에서 weak positive의 결과를 얻을 수 있었으며 동정이 된 균은 *M. avium*과 *M. intracellulare*로 나타났다.

고 찰

항산균 염색을 이용한 객담 도말검사는 MTB와 NTM을 구별할 수 없다는 제한점이 있어[4] 본 실험에서는 이러한 단점을 가지고 있는 기존의 검사법을 대신하여 요즘은 새로이 사용하고 있는 분자생물학적 방법을 이용하여 도말 방법과 비교하여 보았다.

그 결과 *rpoB* gene을 이용한 one-tube nested PCR법은 소요 시간도 짧고 결과에서도 MTB와 NTM의 구별이 가능한 방법으로 확인되어 PCR 검사가 MTB와 NTM을 신속히 구분하는데 유용함을 다시 한번 확인할 수 있었다[16]. 검출률은 약 87%의 결과를 보여주었다. 또한 이 방법에서는 검출되지 않았던 34검체에 대해 16S-23S rRNA spacer gene을 이용한 two-tube nested PCR법을 이용하여 실험한 결과 검출률이 93%까지 올라감이 확인되었다. 그러나 93%까지 검출률을 올렸던 16S-23S rRNA spacer gene을 이용한 방법에서는 *rpoB* gene을 이용한 방법이 MTB와 NTM을 구분할 수 있었던 것에 비해 MTB의 유무 및 PCR 저해제의 유무만을 확인할 수 있었다는 단점이 있다. 이러한 부분을 생각할 때 one-tube nested PCR법 및 two-tube nested PCR법을 시행하여 검출률을 높이는 것이 바람직하다 하겠으나, 현실적으로 우리나라의 보험체계상 쉽지 않다고 한다면 상대적으로 병원성이 높은 MTB를 검출할 수 있고 검출률 또한 높은 two-tube nested PCR법을 먼저 사용하도록 하는 것이 바람직하다 할 수 있을 것이다. 이 부분은 앞으로 지속적인 연구를 통해 보완해 나가야 할 부분이라 생각한다. 국내의 한 종합병원에서 비교한 바에 의하면 도말양성, 배양양성 검체에서 PCR법이 88.8%의 민감도와 86.8%의 특이도를 갖는다는 발표를 한 것이 있다. 그러나 본 실험은 도말결과와 배양결과를 함께 가지고 PCR법과 비교하여 민감도 및 특이도를 비교했던 실험에 비해[17] 도말결과만을 가지고 있어 앞으로 실험에서 배양결과를 추가하는 실험을 하여 결과를 보완하고 비교할 수 있어야 할 것으로 생각된다.

NTM 폐질환을 일으키는 비율은 미국, 캐나다 및 서유럽에서는 객담에서 NTM이 분리되는 사람 중 약 40~50%[9,18], 홍콩, 일본 등 아시아 국가에서는 약 10~20%[19,20]로 보고되고

있다. 우리나라에서는 1980년대 NTM 폐질환에 대한 몇몇 증례보고에 이어 1990년 이후 임상검체에서 배양된 NTM의 균종별 분포[13]와 실제 폐질환을 가진 환자들에서의 원인균의 분포에 대한 몇몇 연구가 이루어졌다. NTM증 전국 실태조사에 의하면 1990년 이후 NTM의 분리율 및 질병 빈도가 빠른 속도로 증가하고 있음을 알 수 있다[21]. 미국과 달리 국내의 경우 결핵의 유행률과 발생률이 높고 NTM 폐질환의 빈도가 낮아 객담에서 항산균 도말 양성일 경우 대부분 결핵으로 간주하여 왔으며, 균 배양 후에도 MTB와 NTM을 구별하고 있는 검사실은 많지 않다[22]. 따라서 PCR 검사는 주로 항산균 도말 음성 환자에서 결핵이 의심될 경우 진단의 민감도를 높이기 위하여 실시되어 왔다[23]. 그러나 국내에서도 NTM증이 증가하고 있으며[13] 최근 한 연구에서 항산균 도말 양성, 배양 양성 검체의 12.2%가 NTM임이 보고되기도 하였다[17].

본 실험에서는 도말 양성 검체에 대해 PCR을 통한 NTM의 분리를 실시하였고 그 비율이 2.1%에 그쳐 그간 국내외의 많은 연구결과에 비해 NTM의 분리 비율이 상당히 낮은 결과를 얻었다. 이러한 낮은 분포의 원인으로서는 첫째, 실험기간이 상대적으로 짧았던 것을 원인으로 들 수 있을 것이다. 도말 양성 객담 중 NTM 분리비율이 1997년 하반기 6.5%에서 2001년 상반기 10.8%, 2001년 하반기 17.8% 등으로 최근 4년 6개월간 지속적으로 증가하고 있음을 확인했던 실험[14]에 비해 실험기간이 상대적으로 짧았다. 이는 본 실험의 NTM 분리 비율이 실제로 낮은 수준을 보여주는 것인지 단지 일시적인 감소현상을 보여주는 것이었는지 앞으로 지속적인 실험관찰을 통하여 확인해 보아야 할 것으로 생각한다. 둘째, 지역적인 폐쇄성을 고려해 보아야 할 것이다. 4년 6개월간 증가의 추세를 보여줬던 병원은 전국적인 환자가 내원하는 3차 병원인 것에 비해 본 실험의 검체가 모여진 병원은 지역적인 특색을 갖는 2차 병원이라는 것이다. 실제로 미국에서의 한 예를 보면 지역과 보고된 시기에 따라 항산균 도말양성 객담에서 NTM의 분리비율이 낮게는 1.7%, 3.5%, 8.5% 등으로 보고되고 있지만, 최근 보고에 의하면 Colorado 지역에서는 24.8%, Texas 지역에서는 48.5%까지 항산균 도말양성 객담에서 NTM이 분리된다고 한다. 그러나 여기서 환자들의 내원 성향이 2차 병원에서는 처음 내원하는 환자일 수도 있고 3차 병원에서는 다회 내원 환자일 수가 있다는 것도 고려해 보아야 할 부분일 것이다.

미국과 일본에서 NTM 폐질환의 가장 흔한 원인균은 *M. avium* complex (MAC) 60~80%를 차지하며[9,10], 우리나라에서도 NTM 폐질환 원인균의 50~60%를 차지하고 있다[13,24]. MAC 감염증에서 구체적인 원인균은 환자의 기저질환에 따라 다르다. 후천성 면역결핍증 환자에서는 MAC 감염증이 주로 파종성 질환으로 발생하며 원인균으로 *M. avium*이 90% 이상을 차지하지만[7,25], 면역저하가 없는 환자에서 MAC 감염증은 주로 폐질환으로 발생하며 70% 이상이 *M. intracellulare*에

의해 발생한다[26,27]. 또 다른 국내의 연구에 의하면 MAC 중 에서 *M. intracellulare*가 국내 NTM 폐결핵의 더 흔한 원인균 이라고 한다[28]. 본 실험에서도 분리된 NTM을 동정한 결과 *M. avium*, *M. intracellulare*가 분리되어 위의 연구자들이 밝힌 사실을 확인하였다.

이상의 결과에서 살펴보았듯이 폐결핵의 진단에 있어 NTM 의 구분 및 동정이 중요시되고 있다. 본 실험에서 동정되어 밝혀진 *M. avium* 및 *M. intracellulare*를 보유한 환자의 치료경과 를 보면 폐결핵으로 진단되고 결핵 약제를 복용했던 기록들이 있다. 그러나 그 경과가 좋지 않아 균종 동정에 들어가고 그 결 과 NTM으로 판명 및 동정되어 그에 대처하는 새로운 약제가 투여되고 있는 것이 확인되었다. 본 실험에서는 낮은 수준의 NTM 분리비율이 나왔지만 국내의 다른 연구에서는 10%이상 의 NTM 분리비율이 나타나고, 그 추세가 증가되는 현상을 보 이고 있다는 것[14]을 고려할 때 NTM의 분리와 동정의 중요성 이 강조되어야 할 것으로 생각한다. 또한 본 실험에서는 분자생 물학적 방법을 이용하여 *rpoB* 유전자를 이용한 PCR-RFLP 방법 을 이용하였으나, 이러한 방법에서 약 3% 정도에서 균동정이 안되고 있는 것으로 알려져 있다[29,30]. 본 실험에서도 동정이 안 된 한 검체가 있는 것이 확인되었다. 이러한 경우 두 가지 이상의 NTM이 분리되는 것이 아닌지 확인해야 할 것으로 생 각된다. 실제로 일부 환자에서는 두 가지 이상의 NTM이 분리 되어, 원인균을 잘못 판단할 수 있다고 하였다[28].

결론적으로 호흡기 검체로부터 MTB과 NTM을 구분함에 있 어, NTM의 비율이 높게 변화되어가는 추세를 알아야 할 것이며, NTM의 구분에 PCR을 이용한 방법이 신속하다는 것을 확인하였 다[16]. 호흡기 검체에서 NTM이 분리된 사실 자체가 NTM 폐결 핵이 있다는 뜻은 아니므로[28], 분리되는 NTM에 대하여는 동정 이 이루어져야 할 것이다. 동정이 된 NTM은 그 균종에 따른 발 병력의 차이가 있어 MAC를 비롯한 *M. kansasii*, *M. chelonae/abscessus* 등이 발병력이 높은 편이고, 상대적으로 *M. fortuitum complex*는 발병력이 낮다는[9] 것을 참고하여야 할 것이라 생각 한다. 이렇게 동정이 되어진 결과는 절대적으로 신뢰하기보다는 약 3% 정도의 PCR-RFLP 법에서 동정이 안 되고, 2가지 이상의 NTM 감염 가능성에 대해서도 생각해 보아야 할 것이다. 실험의 대상자를 조사한 것에서 알 수 있듯이 NTM에 대한 신속한 발견 을 통해 적절한 약제를 투여함으로써 환자의 고통과 시간적, 경 제적 낭비를 줄일 수 있으리라 생각한다.

참 고 문 헌

- Snider DE Jr and La Montagna JR. The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress in Tuberculosis. *J Infect Dis* 1994;169:1189-96.
- Bloom BR and Murray CJL. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. *Science* 1992;257:1055-64.
- Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;72:1-6.
- Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adult and children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-95.
- Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease. Diagnostic standards of pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* 1997;44:1447-53.
- Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:593-4.
- Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:S1-25.
- British Thoracic Society. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax* 2000;55:210-8.
- O'Brien RJ, Geiter LJ, Snider DE Jr. The epidemiology of non-tuberculous mycobacterial disease in the United States. Result from a national survey. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1007-14.
- Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, Arakawa H, Kuze A. Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1280-4.
- Yates MD, Pozniak A, Uttley AH, Clarke R, Grange JM. Isolation of environmental mycobacteria from clinical specimens in South-East England: 1973-1993. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:75-80.
- Kim JS, Kim WB, Suh JJ, Hah YM, Kim YM. Scotochromogens from tuberculosis patients. *Korean J Pathol* 1968;1:39-43.
- Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease. National survey of mycobacterial disease other than tuberculosis in Korea. *Tuberc Respir Dis* 1995;42:277-94.
- Koh WJ, Kwon OJ, Yu CM, Jeon KM, Suh GY, Chung MP, et al. Recovery rate of non-tuberculous mycobacteria from acid-fast bacilli smear-positive sputum specimens. *Tuberc Respir Dis* 2003; 54:22-32.
- Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. Specific identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J Clin Microbiol* 2000;38:2966-71.
- Lee JS, Ji HS, Hong SB, Oh YM, Lim CM, Lee SD, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction for the differentiation of nontuberculous mycobacteria in patients with acid-fast bacilli smear-positive specimens. *Tuberc Respir Dis* 2005;58:452-8.
- Lee JY, Choi HJ, Lee H, Joung EY, Huh JW, Oh YM, et al. Recovery rate and characteristics of nontuberculosis mycobacterial isolates in a university hospital in Korea. *Tuberc Respir Dis* 2005;58:385-91.
- Good RC, Snider DE Jr. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1980. *J Infect Dis* 1982;146:829-33.
- Sakatani M. Nontuberculous mycobacteriosis; the present status of epidemiology and clinical studies. *Kekkaku* 1999;74:377-84.
- Hosker HS, Lam CW, Ng TK, Ma HK, Chan SL. The prevalence and clinical significance of pulmonary infection due to non-tuberculous mycobacteria in Hong Kong. *Respir Med* 1995;89:3-8.
- Scientific Committee in Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory. Diseases other than tuberculosis in Korea. *Tuberc*

- Respir Dis 1995;42:277-94.
22. Kim MN, Lee SH, Yang SE, Pai CH. Mycobacterial testing in hospital laboratories in Korea: results of a survey of 40 university or tertiary-care hospitals. Korean J Clin Pathol 1999;19:86-91.
 23. Baek SH, Lee JM, Kang MJ, Son JW, Lee SJ, Kim DG. How reliable is sputum PCR test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis when sputum smear is negative? Tuberc Respir Dis 2001;50:222-8.
 24. Koh WJ, Kwon OJ, Ham HS, Suh GY, Chung MP, Kim HJ, et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens. Korean J med 2003;65:10-21.
 25. Horsburgh CR Jr, Selik RM. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome [AIDS]. Am Rev Respir Dis 1989;139:4-7.
 26. Wallace RJ Jr, Zhang Y, Brown BA, Dawson D, Murphy DT, Wilson R, et al. Polyclonal Mycobacterium avium complex infections in patients with nodular bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158:1235-44.
 27. Obayashi Y, Fujita J, Suemitsu I, Kamei T, Nii M, Takahara J. Clinical features of non-tuberculous mycobacterial disease: comparisons between smear-positive and smear-negative cases, and mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:597-602.
 28. Koh WJ and Kwon OJ. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. Tuberc Respir Dis 2004;56:5-17.
 29. Hong SK, Kim BJ, Yun YJ, Lee KH, Kim EC, Park EM, et al. Identification of Mycobacterium tuberculosis by PCR-linked reverse hybridization using specific rpoB oligonucleotide probes. J Microbiol Methods 2004;59:71-9.
 30. Kim BJ, Hong SK, Lee KH, Yun YJ, Kim EC, Park YG, et al. Differential identification of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene [rpoB]. J Clin Microbiol 2004;42:1308-12.

=국문초록=

중합효소연쇄반응을 이용한 결핵균과 비정형 결핵균의 감별동정

¹가톨릭대학교 성빈센트병원 진단검사의학과, ²연세대학교 보건환경대학원 의생명과학과

이성덕¹, 이해영², 김현철², 김수영¹

배경: 본 실험에서는 신속하고 정확하며 결핵 및 비결핵균을 검출하고 동정할 수 있는 PCR 결과와 염색결과를 비교하여 그 검출률을 비교하고자 하였다.

방법: 255개의 항산성염색 양성 호흡기 검체를 대상으로 하였다. *rpoB* gene을 이용한 one-tube nested PCR로써 결핵균 및 비정형 결핵균에 모두 존재하는 360 bp와 결핵균에만 존재하는 190 bp의 부위를 증폭했으며 이 실험을 통하여 음성으로 판독되었던 34검체에 대하여 16S-23S rRNA spacer gene을 target으로 한 two-tube nested PCR을 시행하였다. One-tube nested PCR 결과 비정형 결핵균으로 판독된 검체를 대상으로 PCR-RFLP법을 이용한 마이코박테륨 동정을 시행하였다.

결과: Two-tube nested PCR을 시행하여 one-tube nested PCR에 의한 221 검체 약 87%의 결핵균 검출률을 237 검체 93%까지 향상시킬 수 있었다. PCR-RFLP법을 이용한 마이코박테륨 동정을 시행한 결과 임상적으로 의의가 있는 *M. avium* 3 검체와 *M. intracellulare* 1 검체가 동정되었다.

결론: 항산성 염색 결과 양성인 검체를 대상으로 PCR 검사법을 이용한 결핵 및 비정형 결핵균의 감별동정을 시행하는 것이 정확한 진단에 유용함을 확인하였다. [대한임상미생물학회지 2007;10:135-142]

교신저자 : 이성덕, 442-723, 경기도 수원시 팔달구 지동 93-6
가톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원 진단검사의학과
Tel: 031-249-7642, Fax: 031-244-6786
E-mail: start2033@paran.com