Korean J Clin Microbiol Vol. 14, No. 1, March, 2011
DOI: 10.5145/KJCM.2011.14.1.36

A Case of a 63-bp Deletion in the *mpt64* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Which Showed False Negativity in the Immunochromatographic Assay

Chang Eun Yoon, Young Joon Hong, Jin Kyung Lee, Yoon Hwan Chang, Seok-Il Hong

Department of Laboratory Medicine, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) is discriminated from non-tuberculous mycobacteria (NTM) via an immunochromatographic assay (ICA) which is based on the reactions of monoclonal antibodies against MPT64, one of the predominant proteins excreted by MTBC. Recently, the authors of the present study discovered SD TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* strains. In addition, sequence analysis of the *mpt64* genes in these strains was performed and showed a deletion of 63 bp from nucleotides 196 to 258. In cases of MPT64-negative mycobacterium, the authors recommend performing TB PCR for correct diagnosis. **(Korean J Clin Microbiol 2011;14:36-38)**

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, *mpt64* gene, Mutation

서 론

결핵의 원인균은 *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC)이지만, *Mycobacterium avium* complex (MAC)와 *Mycobacterium kansasii* 같은 몇몇 비결핵항산균(non-tuberculous Mycobacteria, NTM)도 다른 호흡기 질환의 원인이 될 수 있다[1]. MTBC와 NTM의 감별진단에 임상증상이나 병력조사가 도움이 되지만, 적절한 치료를 위해서는 정확한 감별검사가 중요하다. MTBC는 33개 이상의 단백질을 분비하는 것으로 알려져 있다[2]. 그 중 MPT64는 MTBC의 발병기전에 관여하는 것으로 추정되는 단백질로, 결핵균이 활발하게 증식될 때만 분비되나[3] 결핵균 및 *Mycobacterium bovis*의 몇몇 아균주의 배양액에서만 발견되기 때문에 MTBC와 NTM의 감별진단 시 유용하게 사용될 수 있다[4]. SD Bioline TB Ag MPT64 (Standard Diagnostics, Inc., Yongin, Kyonggi, Korea)는 면역크로마토그래픽법(immunochromatographic assay, ICA)을 사용하여 MPT64 protein의 유무를 알아냄으로써 MTBC와 NTM을 빨리 구별해 낼 수 있는 kit이다[5]. 검체가 kit의 sample well에 공급되면, 검체점적부위에 있는 antibody-colloidal gold conjugate가 MPT64 antigen과 결합하여 complex를 형성하고 이동하여, 검사선 영역에서 mouse monoclonal anti-MPT64에 결합해서 antibody-antigen-antibody complex를 형성한다. 이때 MPT64 양성인 경우에는 보라색으로 발색하게 된다. 이 kit를 이용한 ICA 검사결과 SD TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* strain을 경험하였기에 이를 보고하는 바이다.

증 례

75세 여자 환자가 두 달간 지속된 기침을 주소로 내원하였다. 흉부의 방사선촬영과 전산화단층촬영 검사결과 결핵이 의심되었고, 항산성 염색에서 양성소견 보였으며 객담배양검사(3% Ogawa 배지)에서 *Mycobacterium*이 검출되었다. 그리고 NTM과 MTBC를 구별하기 위해 3% Ogawa 배지에서 배양된 집락을 SD Bioline TB Ag MPT64로 ICA검사를 시행하였다. SD Bioline TB Ag MPT64는 면역크로마토그래픽법(immunochromatographic assay, ICA)을 사용하여 MPT64 protein의 유무를 알아냄으로써 MTBC와 NTM을 빨리 구별해 낼 수 있는 kit이다[5]. 검체가 kit의 sample well에 공급되면, 검체점적부위에 있는 antibody-colloidal gold conjugate가 MPT64 antigen과 결합하여 complex를 형성하고 이동하여, 검사선 영역에서 mouse monoclonal anti-MPT64에 결합해서 antibody-antigen-antibody complex를 형성한다. 이때 MPT64 양성인 경우에는 보라색으로 발색하게 된다.

3% Ogawa 배지에서 배양한 3~4개의 colony와 200 μL의 extraction buffer를 섞은 배양액에서 100 μL를 kit의 점적부위에 떨어뜨려 관찰한 결과, 음성으로 NTM으로 동정되었다. 그

Received 4 May, 2010, Revised 28 June, 2010
Accepted 20 July, 2010
Correspondence: Seok-Il Hong, Department of Laboratory Medicine, Korea Cancer Center Hospital, 215-4 Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea. (Tel) 82-2-970-2492, (Fax) 82-2-973-7143, (E-mail) hongsicp@kcch.re.kr

러나 SLAN real time PCR detection system (LG lifescience, Seoul, Korea)으로 시행한 확진검사에서는 MTBC로 동정되어 ICA 검사결과와 일치하지 않았다.

동정된 균주를 *mpt64* 유전자에 돌연변이가 있어서 MPT64를 생성하지 않는 MTBC로 의심하였고, *mpt64* 유전자(gene bank accession number U82235)의 sequence analysis를 시행하였다. Sequence analysis는 다음의 프라이머를 사용하여 시행되었다: F30 (5'-GTCAGGCATCGTCGTCAGC), F404 (5'-TCCACGCG AAGCCCCCTAC), R433 (5'-TGGTATGTGGCCGAGGTGA), R891 (5'-CAGTGGGCGCACCGAACAC). PCR은 iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)으로 실시하였고, direct sequencing은 ABI Prism 3730XL Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing kit (ABI Prism)를 사용하여 시행되었다. Sequence analysis 결과 *mpt64* 유전자의 뉴클레오티드 196에서 258까지의 63-bp 결손이 발견되었다.

이 균주는 14가지 항결핵 약제(isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, kanamycin, prothionamide, cycloserine, ofloxacin, para-aminosalicylic acid, capreomycin, rifabutin, moxifloxacin, levofloxacin, amikacin)에 대한 감수성 검사와 pyrazinamidase test를 네오딘 의학연구소에 의뢰하여 실시한 결과, 15가지의 모든 항결핵 약제에 대해서 감수성이 있었다.

고　찰

Park 등은 SD bioline TB Ag MPT64 rapid로 NTM과 MTBC를 구별할 수 있는 능력을 평가하였다[5]. 모든 세균, 진균, NTM의 분리주는 ICA에 의해 음성인 결과가 나왔지만, 219개의 MTBC 분리주의 ICA 검사에서는 217개만이 양성인 결과였고 2개는 위음성인 결과가 나왔다. 위음성인 결과가 나온 이유로는 *mpt64* 유전자에 돌연변이가 있어서 불완전한 단백질을 생산한 것으로 생각되었지만 *mpt64* 유전자에 대한 sequence analysis는 시행되지 않았다.

SD Bioline TB Ag MPT64는 제조사에 따르면 민감도 98.6%, 특이도 100%이고, Ismail 등은 민감도 97%, 특이도 100%라고 보고하였다[6]. 그리고 Ngamlert 등은 SD Bioline TB Ag MPT64와 같은 원리를 이용하는 Capilia TB (TAUNS, Numazu, Japan)에서도 민감도 97%, 특이도 100%로 SD Bioline TB Ag MPT64의 결과와 비슷하게 보고하였고, 위음성의 원인으로는 우리의 증례와 같은 *mpt64* 유전자에서의 63 bp 결손이 흔하다고 보고하였다[7].

Hirano 등은 Capilia TB를 MTBC와 NTM 감별에 사용하여 MPT64 음성인 MTBC들을 발견하였다[8]. 그리고 MPT64 음성 MTBC에게서 *mpt64* 유전자에 대한 sequence analysis를 실시하였고, 본 증례와 같은 결과인 뉴클레오티드 position 196에서 258까지의 63-bp 결손 3증례와 뉴클레오티드 position 266의 결손 1증례, 뉴클레오티드 position 402의 점돌연변이(G to A) 2증례, 뉴클레오티드 512에서 687까지의 176-bp 결손 5증례, 뉴클레오티드 position 501에서의 IS6110 삽입(1,358 bp) 1증례 등이 발견되었다. 그리고 앞의 12개의 균주들에 대해서 생화학동정검사를 실시하였는데, 모든 균주가 niacin accumulation, pyrazinamidase, nitrate reductase test에 양성이고 thiophene-2-carboxylic acid hydrazide를 함유한 배지에 자라는, 전형적인 MTBC의 특징을 보였다.

Hillemann 등도 Capilia TB를 MTBC와 NTM 감별에 사용하여 MPT64 음성인 MTBC들을 발견하였는데, 위음성인 결과가 나온 MTBC 균주 모두에서 *mpt64* 돌연변이가 존재하였다[9].

본원에서는 2009년 4월 8일부터 2010년 7월 21일까지 객담, 기관지 흡인액, 흉수 검체 등으로 SD Bioline TB Ag MPT64 검사를 실시한 결과 MTBC 56건, NTM 24건이 나왔다. 그리고 TB PCR을 시행한 NTM 8건 중 1건이 MTBC인 결과로 나온, 본 증례의 균주이다. Hirano 등은 MPT64 음성인 MTBC에 대하여 생화학동정검사를 실시하여 전형적인 MTBC의 결과와 동일하다는 것을 확인하였지만[8], 본원의 증례에서는 생화학동정검사는 실시하지 않았고, pyrazinamidase test를 네오딘 의학연구소에 의뢰하여 양성임을 확인하였다. Hirano 등은 일본 내의 조사를 통해, 돌연변이를 가진 균주들 사이에서 역학적인 관련성은 관찰되지 않는다고 보고하였고, *mpt64* 유전자 내에 쉽게 돌연변이가 일어나는 부위가 존재한다고 추측하였다[8]. 국내에서도 돌연변이를 가진 균주들의 지역적 특징 조사가 필요하다고 생각된다.

SD Bioline TB Ag MPT64 검사는 MTBC와 NTM을 구별하는 간단하고 빠른 검사이고 민감도와 특이도도 뛰어나지만 *mpt64* 유전자의 돌연변이가 있는 MTBC의 경우에는 NTM으로 잘못 진단할 수 있다. 그래서 MPT64 음성인 mycobacterium인 경우에는 정확한 진단을 위해서 확인 검사를 시행하여야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 원자력병원 방사선조직유전자은행운영사업 연구비(계정번호: 740802) 지원에 의하여 수행된 것임.

참 고 문 헌

1. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996;9:177-215.
2. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 1998;393(6685):537-44.

3. Wang Z, Potter BM, Gray AM, Sacksteder KA, Geisbrecht BV, Laity JH. The solution structure of antigen MPT64 from Mycobacterium tuberculosis defines a new family of beta-grasp proteins. J Mol Biol 2007;366:375-81.
4. Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1991;59:372-82.
5. Park MY, Kim YJ, Hwang SH, Kim HH, Lee EY, Jeong SH, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical isolates. J Clin Microbiol 2009;47:481-4.
6. Ismail NA, Baba K, Pombo D, Hoosen AA. Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis from broth cultures. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13:1045-7.
7. Ngamlert K, Sinthuwattanawibool C, McCarthy KD, Sohn H, Starks A, Kanjanamongkolsiri P, et al. Diagnostic performance and costs of Capilia TB for Mycobacterium tuberculosis complex identification from broth-based culture in Bangkok, Thailand. Trop Med Int Health 2009;14:748-53.
8. Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative Mycobacterium tuberculosis isolates. J Clin Microbiol 2004;42:390-2.
9. Hillemann D, Rüsch-Gerdes S, Richter E. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2005;9:1409-11.

=국문초록=

신속면역크로마토그래픽법을 이용한 결핵균 검사결과 위음성을 보인 *Mycobacterium tuberculosis*에서 관찰된 *mpt64* 유전자의 63 bp 결손 1예

원자력병원 진단검사의학과

윤창은, 홍영준, 이진경, 장윤환, 홍석일

면역크로마토그래픽법(immunochromatographic assay, ICA)을 사용하여 *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC)를 non-tuberculous mycobacteria (NTM)와 감별한다. 이 방법은 MTBC에서 분비되는 주요한 단백질인 MPT64에 대한 monoclonal antibody의 반응에 기초를 두고 있다. 최근 원자력병원에서 SD TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* strains를 발견하였고 *mpt64* 유전자의 sequence analysis를 시행한 결과 뉴클레오티드 196에서 258까지의 63 bp 결손을 발견하였다. MPT64 음성인 mycobacterium이 발견된 경우에는 정확한 진단을 위해서 TB PCR을 시행할 필요가 있다. **[대한임상미생물학회지 2011;14:36-38]**

교신저자 : 홍석일, 139-706, 서울시 노원구 공릉 2동 215-4
원자력병원 진단검사의학과
Tel: 02-970-2492, Fax: 02-973-7143
E-mail: hongsicp@kcch.re.kr