

중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성을 이용한 비결핵항산균의 분리

박철민¹ · 허세란¹ · 박경운¹ · 송정환¹ · 이재호² · 이춘택² · 김익종¹

서울대학교 의과대학 검사의학교실¹, 내과학교실²

Isolation of Nontuberculous Mycobacteria Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

Chul Min Park, M.D.¹, Se Ran Heo¹, Kyoung Un Park, M.D.¹, Junghan Song, M.D.¹, Jae Ho Lee, M.D.²,
Choon Taek Lee, M.D.², and Eui Chong Kim, M.D.¹

Departments of Laboratory Medicine¹ and Internal Medicine², Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The isolation rate of nontuberculous mycobacteria (NTM) in clinical laboratories and the incidence of NTM infections are on the increase recently in Korea, but there have been only a few studies that reveal the general aspect of NTM isolation or species distribution. Therefore, this study was performed to examine the isolation rate of NTM, species identification, and the clinical significance of mycobacterial cultures.

Methods : From August 2004 to May 2005, we examined mycobacterial isolates by AccuProbe test to differentiate NTM from *Mycobacterium tuberculosis* complex. NTM was then identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length analysis (PCR-RFLP).

Results : A total of 6,742 specimens from 2,784 patients were requested for mycobacterial culture. Mycobacteria were isolated from 776 specimens (11.5%). The isolation rates of NTMs among the total culture positive specimens and culture positive sputum specimens were 24.4% (189/776) and 25.3% (169/667), respectively. Fourteen species of NTM identified in 172 of the 175 specimens tested included *M. avium* (39.0%), *M. intracellulare* (22.7%), and *M. abscessus* (19.8%).

Conclusions : Using AccuProbe tests and PCR-RFLP method for mycobacterial cultures processed in a clinical laboratory, we were able to identify NTMs to the species level. The isolation rate of NTM in this study was similar to that reported in past studies in Korea. In addition, we found that some of the NTMs isolated in this study could cause pulmonary diseases. (*Korean J Lab Med* 2006;26:161-7)

Key Words : Nontuberculous mycobacteria, Polymerase chain reaction, Restriction fragment length polymorphism, Pulmonary disease

서론

결핵균과는 달리 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria,

NTM)은 물과 토양 등 자연환경에 정상적으로 존재하고 있으며 [1], 후천성면역결핍증 환자뿐만 아니라 면역기능이 정상인 사람에서도 감염을 일으킬 수 있음이 알려져 있다[2]. 최근에 과거에 비해 비결핵항산균이 임상 검체에서 분리되는 경우가 많아지고 있으며, 비결핵항산균과 관련된 질환의 빈도도 증가하면서, 비결핵항산균 관련 질환에 대한 진단 및 치료 방법에 대한 관심이 한층 높아졌다[3, 4]. 일본의 경우 전체 마이코박테리아에 의한 질환 중 비결핵항산균에 의한 경우가 29.2%에 달한다는 보고가 있었고[5], 최근 국내 연구에서도 전체 항산균 중 약 30% 정도에서

접 수 : 2005년 12월 16일 접수번호 : KJLM1912
수정본접수 : 2006년 4월 1일
게재승인일 : 2006년 5월 17일
교신저자 : 박 경 운
우 463-707 경기도 성남시 분당구 구미동 300
분당서울대학교병원 진단검사의학과
전화 : 031-787-7692, Fax : 031-787-4015
E-mail : m91w95@dreamwiz.com

비결핵항산균이 분리되고 있고 이 중 상당수가 실제 질환과 관련이 있음이 보고되고 있다[6, 7].

현재 미국의 경우 객담 항산균 도말검사서 양성인 경우, 핵산 증폭검사를 시행하여 잠정 진단하고 최종 진단은 반드시 배양결과를 가지고 확인하도록 권장하고 있다[8]. 그러나, 국내의 경우 상대적으로 결핵의 유병률과 발생률이 높고 비결핵항산균 폐질환의 빈도가 낮다고 간주되어, 객담 항산균 도말검사서 양성일 경우 대부분 결핵으로 간주하여 왔으며, 배양 후에도 결핵균과 비결핵항산균을 구별하고 있는 검사실은 많지 않은 실정이다[9]. 그러나, 최근 국내에서도 비결핵항산균 질환이 증가하는 추세이며[10], 따라서 비결핵항산균 균주와 비결핵항산균 질환에 대한 체계적인 연구와 검사실 차원의 정확한 비결핵항산균 동정이 요구되고 있다. 본 연구에서는 경기도 지역의 한 종합병원에서 10개월 동안 의뢰된 항산균 도말 및 배양 검사를 분석하여 비결핵항산균이 분리된 경우 균종 수준까지 동정하고, 비결핵항산균과 관련된 폐질환의 빈도와 그 원인균의 양상을 밝히려 한다.

대상 및 방법

1. 대상

2004년 8월에서 2005년 5월까지 분당서울대병원에서 항산균 도말 및 배양 검사가 의뢰된 경우를 대상으로 하였다.

2. 항산균 도말 및 배양 검사

항산균 도말 검사는 칠-넬센 염색법을 이용하였다. 배양검사는 고체배지의 일종인 3% Ogawa 배지(Shin-yang chemical, Seoul, Korea)를 이용하였으며, 최대 8주까지 배양하였다. 항산균 도말 검사와 배양 검사의 결과는 미국질병예방통제국(Center for Disease Control & Prevention)과 미국흉부학회(American Thoracic Society)에서 제시한 기준에 따라 판독하였다[11]. 만약 집락에 대한 칠넬센 염색 결과, 항산균이 아닐 경우 비항산균에 의한 오염으로 간주하였다.

3. 비결핵항산균의 균종 동정

배양된 집락을 이용하여 분리된 모든 항산균을 대상으로 AccuProbe 검사(Gen-Probe Inc. San Diego, CA, USA)를 시행하여 결핵균과 비결핵항산균으로 구분하였다. AccuProbe 검사로 비결핵항산균으로 판단한 균주의 경우, *ipoB* 유전자를 대상으로 중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP, PRA)을 이용하는 Myco-ID (M&D, Seoul, Korea) 검사를 시행하여 비결핵항산균의 균종 수준까지 동정하였다.

1) AccuProbe 검사

키트에 포함된 Lysing Reagent Tube에 Reagent 1 (lysis reagent)과 Reagent 2 (hybridization buffer)를 각각 100 μ L씩 넣고, 배지에서 자란 집락을 루프를 이용하여 채취하여 Lysing Reagent Tube에 넣고 루프를 흔들어 서로 잘 혼합하였다. 이 Lysing Reagent Tube를 초음파 발생장치에서 15분간 반응시키고 95 \pm 5 $^{\circ}$ C 수조에서 10분간 반응시킨 후, 100 μ L를 피펫으로 취해 Probe Reagent Tube로 옮긴 다음 60 \pm 1 $^{\circ}$ C 수조에서 15분간 반응시켰다. Reagent 3 (selection reagent)을 300 μ L 넣고 잘 혼합하고, 다시 60 \pm 1 $^{\circ}$ C 수조에서 10분간 반응시킨 후, 실온에서 5분 이상 방치한 뒤 1시간 이내에 발광 정도를 측정하였다. 이때 30,000 RLU (relative light units) 이상이면 결핵균(*M. tuberculosis* complex)으로, 이하이면 비결핵항산균으로 판독하였다.

2) Myco-ID 검사

키트에 포함된 PCR premix (Taq 중합효소, 시발체, dNTPs, 완충액 포함)에 검체에서 분리한 DNA를 넣고, 8-MOP (8-methoxysoralen) 용액을 첨가하여 최종 50 μ L가 되게 하였다. 이 혼합용액을 thermal cycler를 이용하여 변성 단계 94 $^{\circ}$ C 20초, 단련 단계 58 $^{\circ}$ C 20초, 연장 단계 72 $^{\circ}$ C 30초의 조건에서 35주기를 반응시켰다(중합효소연쇄반응). 반응 산물 5 μ L를 2% TBE 우무겔에 점적한 다음 100 V에서 25분간 전기영동을 한 뒤, 360 bp의 중합효소연쇄반응 산물을 확인하였는데, 이때 중합효소연쇄반응의 산물이 약하거나 제대로 증폭되지 않을 경우에는 추가로 이중중합효소연쇄반응(nested polymerase chain reaction)을 하였고, 변성 단계 94 $^{\circ}$ C 1분, 단련 단계 72 $^{\circ}$ C 30초, 연장 단계 72 $^{\circ}$ C 1분의 조건으로 35주기 반응시켰다. 중합효소연쇄반응의 산물이 확인되면, 제한효소가 포함된 제한효소반응액(*MspI* 0.5 μ L, 10 \times *MspI* buffer, 멸균된 증류수 2.5 μ L)에 15 μ L을 넣고 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 제한효소반응액에서 10 μ L를 취해 4% Metaphor TBE 우무겔에 점적한 뒤 전기영동장치를 얼음에 담아 100 V에서 60-75분간 전기영동 하고, ethidium bromide로 염색한 뒤 자외선 투과조명기로 제한효소반응에 의한 절편의 크기를 확인하여, 키트에 포함된 '마이코박테리아 및 노카디아 동정 알고리즘' 표와 비교하여 균을 동정하였다. 여러 균과 일치하는 결과가 나왔을 경우에는 제한효소 *HaeIII*를 이용하여 *MspI*의 경우와 같은 조건에서 한번 더 제한효소반응을 실시하여 균을 최종적으로 감별 동정하였다.

4. 결과 분석

검체 종류에 따른 비결핵항산균 분리율 및 각 비결핵항산균 균종의 분리율을 분석하였다. 호흡기 검체에서 비결핵항산균이 동정된 환자의 경우, 의무기록의 분석을 통해 증상과 동반 질환을 포함한 임상상을 파악하고, 항산균 도말 및 배양 결과와 단순 흉부촬영 및 컴퓨터 단층촬영 등의 방사선학적 검사 결과를 종합하여,

미국흉부학회(American Thoracic Society)의 비결핵항산균 폐질환 진단 기준[4]을 만족하는지 조사하였다.

결 과

1. 검체 종류별 항산균 배양 성적

연구기간 동안 2,784명의 환자에서 6,742건의 검체가 의뢰되었다. 환자 1명당 검체 수는 평균 2.42개(표준편차 2.29)였다. 300명(10.8%)의 환자에서 의뢰된 776개(11.5%)의 검체에서 항산균이 배양되었다. 항산균이 자라지 않은 검체는 5,862개(86.9%)였고, 104개(1.5%)의 검체는 오염된 것으로 판단하였다. 항산균이 배양된 환자에서 의뢰된 검체 수의 평균은 2.59개(표준편차 2.67)였다(Table 1).

항산균이 배양된 776개의 전체 검체 중 587개(75.6%)의 검체에서는 결핵균이, 189개(24.4%)의 검체에서는 비결핵항산균이 분리되었다. 항산균이 배양된 667개의 객담 검체 중에서는 498개(74.7%)에서는 결핵균이, 169개(25.3%)에서는 비결핵항산균이 분리되었고, 52개의 기관지 세척액 검체 중에서는 14개(26.9%)에서 비결핵항산균이 분리되었다. 항산균이 배양된 300명의 환자 중 182명(60.7%)에서는 결핵균이, 117명(39.0%)에서는 비결핵항산균이 분리되었고, 1명(0.3%)에서는 결핵균과 비결핵항산균이 동시에 분리되었다.

2. 비결핵항산균 분리율

AccuProbe 검사에 의해 비결핵항산균으로 판단된 189개의 검체 중 175개의 검체에 대해 PRA 분석을 시행하여, PCR 증폭산물을 얻는데 실패한 3개의 검체를 제외한 172개의 검체에서 총 14종의 비결핵항산균 균주들을 동정할 수 있었다. *M. avium* (조

Table 1. Summaries of mycobacterial culture by specimen types

Type	N of specimens (%)			
	Total	Culture-positive	MTB	NTM
Sputum	5,261 (78.0)	667 (86.0)	498 (74.7)	169 (25.3)
Bronchial washing	469 (7.0)	52 (6.7)	38 (73.1)	14 (26.9)
CSF	294 (4.4)	5 (0.6)	3 (60.0)	2 (40.0)
Pleural fluid	254 (3.8)	19 (2.4)	19 (100.0)	-
Tissue	95 (1.4)	13 (1.7)	11 (84.6)	2 (15.4)
Ascites	66 (1.0)	1 (0.1)	1 (100.0)	-
Wound	46 (0.7)	4 (0.5)	3 (75.0)	1 (25.0)
Abscess	38 (0.6)	3 (0.4)	3 (100.0)	-
CPS	33 (0.5)	4 (0.5)	4 (100.0)	-
Pericardial fluid	12 (0.2)	2 (0.3)	2 (100.0)	-
Others	174 (2.6)	6 (0.8)	5 (83.3)	1 (16.7)
Total	6,742 (100.0)	776 (100.0)	587 (75.6)	189 (24.4)

Abbreviations: MTB, *M. tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; CSF, cerebrospinal fluid; CPS, cerebroperitoneal shunt.

류형결핵균)이 67개(39.0%) 검체에서, *M. intracellulare*가 39개(22.7%) 검체에서, *M. abscessus*가 34개(19.8%) 검체에서 각각 분리되었고, 4명의 환자에서는 서로 다른 2종의 비결핵항산균이 분리되었다(Table 2). *M. avium*, *M. abscessus*, *M. intracellulare* 세가지 균이 전체 비결핵항산균의 80% 이상을 차지하였는데 이것은 국내의 다른 연구[7, 12]와는 서로 상반된 결과였다(Table 3).

3. 비결핵항산균이 동정된 환자의 임상적 특성

객담과 기관지 세척액을 포함하는 호흡기 검체가 의뢰된 환자 중 미국흉부학회의 비결핵항산균 폐질환 진단 기준에 따라 비결핵항산균 폐질환으로 진단할 수 있는 경우는 19명이었다. 이 중 기관지 세척액 검체로 진단된 경우가 2명이었고, 나머지 17명은 객담이었다. 과거력에서 결핵이 확인된 환자는 6명(31.6%)이었다. 미국흉부학회 진단 기준에 제시된 검사 의뢰 횟수를 만족하는 환자에서 비결핵항산균 폐질환을 가진 환자의 비율은 *M. avium*이 29명 중 6명(20.7%), *M. intracellulare*가 16명 중 7명(43.8%), *M. abscessus*가 11명 중 6명(54.5%)으로 나타났다(Table 2, 4). 그 밖에 뇌척수액에서 *M. mucogenicum*과 *M. pulveris*가 각각 1명에서, 조직 검체에서 *M. abscessus*가 2명에서 분리되었다.

Table 2. Characteristics of isolated nontuberculous mycobacteria species

Species name	N of specimens (%)		N of patients (%)		
	Total	Respiratory	Total	Acceptable*	Pulmonary Ds.†
<i>M. avium</i> complex	106 (62.2)	106 (63.9)	70 (64.8)	45 (78.9)	13 (68.4)
<i>M. avium</i>	68 (39.5)	68 (41.0)	49 (45.4)	29 (50.9)	6 (31.6)
<i>M. intracellulare</i> (type I, II)	39 (22.7)	39 (23.5)	21 (19.4)	16 (28.1)	7 (36.8)
<i>M. abscessus</i>	33 (19.2)	30 (18.1)	16 (14.8)	11 (19.3)	6 (31.6)
<i>M. fortuitum</i>	7 (4.1)	7 (4.2)	6 (5.6)	-	-
<i>M. septicum</i>	5 (2.9)	5 (3.0)	4 (3.7)	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	4 (2.3)	4 (2.4)	3 (2.8)	-	-
<i>M. asiaticum</i>	3 (1.7)	3 (1.8)	2 (1.9)	-	-
<i>M. mucogenicum</i>	3 (1.7)	1 (0.6)	3 (2.8)	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	3 (1.7)	3 (1.8)	1 (0.9)	-	-
<i>M. shimoidi</i>	2 (1.2)	2 (1.2)	2 (1.9)	-	-
<i>M. kansasii</i>	2 (1.2)	2 (1.2)	2 (1.9)	1 (1.8)	-
<i>M. gordonae</i>	1 (0.6)	1 (0.6)	1 (0.9)	-	-
<i>M. peregrinum</i>	1 (0.6)	1 (0.6)	1 (0.9)	-	-
<i>M. pulveris</i>	1 (0.6)	-	1 (0.9)	-	-
Total	172 (100.0)	166 (100.0)	108 (100.0)	57 (100.0)	19 (100.0)

*Patients that agree with specimen requirements defined by ATS guideline; †NTM pulmonary diseases diagnosed by ATS guideline.

Abbreviation: ATS, American Thoracic Society.

고찰

암색소성 집락을 보이는 비결핵항산균의 경우 *M. gordonae* 등

Table 3. Comparison of isolation rates of nontuberculous mycobacteria species in Korea

Species names	This study [N, %]	[7] [N, %]	[12] [N, %]
<i>M. avium</i> complex	106 (62.2)	138 (42.1)	34 (29.0)
<i>M. avium</i>	68 (39.5)	62 (18.9)	10 (8.5)
<i>M. intracellulare</i> (type I, II)	39 (22.7)	76 (23.2)	24 (20.5)
<i>M. abscessus</i>	33 (19.2)	37 (11.3)	4 (3.4)
<i>M. fortuitum</i> complex	7 (4.1)	64 (19.5)*	1 (0.9)
<i>M. septicum</i>	5 (2.9)	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	4 (2.3)	-	-
<i>M. asiaticum</i>	3 (1.7)	-	-
<i>M. mucogenicum</i>	3 (1.7)	3 (0.9)	-
<i>M. scrofulaceum</i>	3 (1.7)	-	-
<i>M. shimoidi</i>	2 (1.2)	-	-
<i>M. kansasii</i>	2 (1.2)	13 (4.0)	33 (28.2)
<i>M. gordonae</i>	1 (0.6)	33 (10.1)	31 (26.5)
<i>M. peregrinum</i>	1 (0.6)	*	2 (1.7)
<i>M. pulveris</i>	1 (0.6)	-	-
<i>M. terrae</i> complex	-	28 (8.5)	-
<i>M. chelonae</i>	-	7 (2.1)	-
<i>M. celatum</i>	-	2 (0.6)	-
Others	-	3 (1.2) [†]	12 (10.3) [‡]
Total	172 (100.0)	328 (100.0)	117 (100.0)

*Fifteen of forty-one *M. fortuitum* complex were proved to be *M. peregrinum* via further analysis; [†] each 1 case of *M. gastri*, *M. szulgai*, *M. violaceofusca*; [‡] 1 *M. marinum* and 11 unclassified NTM.

Table 4. Clinical characteristics of NTM pulmonary diseases by ATS guidelines

No. case	Age (year)	Sex	Culture specimen	Clinical symptoms	Underlying diseases	Radiologic findings of chest	Isolated NTM
1	56	F	bronchial washing	cough, sputum	-	multifocal bronchiectasis	<i>M. avium</i>
2	76	F	sputum	cough	old Tb	centrilobular nodules	<i>M. avium</i>
3	47	F	sputum	chest pain	old Tb	centrilobular nodules	<i>M. avium</i>
4	29	F	sputum	hemoptysis, lymph node enlargement	-	multifocal bronchiectasis	<i>M. avium</i>
5	66	M	sputum	dyspnea, hemoptysis	old Tb	multifocal bronchiectasis	<i>M. avium</i>
6	65	F	sputum	fever, cough	diabetes, hypertension	multifocal bronchiectasis	<i>M. avium</i>
7	62	F	sputum	fever	-	multiple cavities	<i>M. intracellulare</i>
8	64	M	sputum	hemoptysis	asthma	multifocal consolidation & bronchiectasis	<i>M. intracellulare</i>
9	78	F	sputum	cough, sputum	old Tb	bronchovascular infiltration	<i>M. intracellulare</i>
10	57	M	sputum	cough, sputum	-	multiple nodules	<i>M. intracellulare</i>
11	70	M	sputum	fever	old Tb	multifocal patchy opacity	<i>M. intracellulare</i>
12	76	M	sputum	hemoptysis	-	multifocal bronchiectasis	<i>M. intracellulare</i>
13	50	F	sputum	hemoptysis	-	multifocal bronchiectasis	<i>M. intracellulare</i>
14	78	F	sputum	cough, sputum, fever	-	centrilobular nodules	<i>M. abscessus</i>
15	45	M	sputum	cough	MDS	multiple nodules	<i>M. abscessus</i>
16	47	F	bronchial washing	cough	optic neuritis	centrilobular nodule & bronchiectasis	<i>M. abscessus</i>
17	76	M	sputum	fatigue	old Tb	multiple nodular consolidation	<i>M. abscessus</i>
18	64	F	sputum	dyspnea	asthma	multifocal bronchiectasis	<i>M. abscessus</i>
19	70	M	sputum	cough, sputum, fatigue	optic neuritis	nodular patchy opacity	<i>M. abscessus</i>

Abbreviations: NTM, nontuberculous mycobacteria; ATS, American Thoracic Society; Tb, tuberculosis; MDS, myelodysplastic syndrome.

의 비병원성 오염균이 많은 것으로 알려져 있어, 대부분의 검사실에서는 암색소성을 보인 배양의 경우 더 이상의 동정을 하지 않고 있다. 그러나, 암색소성 비결핵항산균이라 할 지라도 충분히 비결핵항산균 질환을 일으킬 수 있으며, 최근에 국내에서도 보고된 바 있다[13]. 암색소성 집락의 확인은 검사자의 주관적인 판단에 의지하기 때문에 자칫 병원성 비결핵항산균이 암색소성으로 판단되어 분리동정에서 제외될 위험성이 있으며[14]. 따라서 암색소성 집락의 경우라도 동정하는 것이 필요하다고 생각한다. 본 연구에서 암색소성으로 알려져 있는 *M. gordonae* 1예와 *M. scrofulaceum* 3예를 동정하였으며, 이들 증례에서 환자의 질환과의 관련은 확인할 수 없었다.

AccuProbe 검사를 이용한 비결핵항산균 분리율이 검체 수를 기준으로 했을 경우의 24.4%에 비해 환자 수를 기준으로 했을 경우 39.0%로 더 높게 나왔다. 이는 결핵균이 동정되었을 경우에는 치료와 함께 추적 배양 검사를 의뢰하는 것에 비하여, 비결핵항산균이 동정된 경우에는 단순한 오염균이나 집락형성균으로 추정하고 더 이상의 추적 검사를 의뢰하지 않았기 때문이라고 생각할 수 있다.

대상 검체 선정과 비결핵항산균의 동정 방법에 따른 차이가 있으나 지금까지의 국내 연구에서 비결핵항산균의 분리율은 12.2-33.0%로 보고되었으며, 최근에는 과거에 비해 비결핵항산균의 분리 빈도가 증가하고 있는 것으로 알려졌다[6, 7, 12, 13, 15-17]. 분리율이 보고에 따라 비교적 큰 차이를 보이는 것은 대상 검체, 동정 방법, 시기, 지역적 분포, 병원 간 환자 특성 차이 등 여러 가지 원인에 의한 것으로 생각된다. 본 연구와 같은 방법을 사용한

최근의 연구[7, 13]에서는 분리율이 21.9-27.8%로 나타나 비교적 차이가 없었다. 이러한 점을 고려하면, 본 논문의 결과는 최근의 국내 비결핵항산균의 분포를 반영하는 것으로 간주할 수 있다.

임상 검체에서 분리된 비결핵항산균을 균종 수준까지 동정하기 위해서는 온도에 따른 집락 증식 속도, 집락 형태, 색소 형성 및 생화학적 방법 등을 사용하는 것이 전통적인 방법이나 많은 시간과 노력이 필요하다는 단점이 있다[11]. 보다 신속하게 비결핵항산균을 동정하기 위한 방법으로 고작위 액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 항산균 세포벽의 구성 성분 중 하나인 마이콜린산(mycolic acid)의 성상을 분석하는 방법[12, 18]이 있으며, 탐색자 교잡법(probe hybridization)을 이용한 DNA 칩 방법도 소개되고 있다[19].

이번 연구에서는 증합효소연쇄반응과 제한절편길이다형성 원리를 이용하여 비결핵항산균 균종을 동정하였다. 이 방법은 HPLC와 같은 고가의 장비가 필요 없으면서, 빠르고 저렴하게 검사가 가능한 장점이 있다. 증폭 대상 유전자 다형성 부위로는 16S rRNA나 *hsp65* 또는 *tpoB*를 많이 사용하고 있다[20]. 본 연구에서는 마이코박테리아의 RNA 증합효소 β -소단위를 코딩하는 *tpoB* 유전자 부위를 증합효소연쇄반응으로 증폭하고, 그 산물을 제한 효소인 *MspI*과 *HaeIII*로 처리하여 균종에 따라 특이적인 절편 양상을 분석하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 다른 PRA법[21]이나 HPLC법[12]보다 많은 총 50여 종의 비결핵항산균 균주와 17종의 노카디아 균주를 동정할 수 있으므로 동정 성공률이 기존 방법보다 비교적 우수하다[22]. 본 연구에서도 비결핵항산균이 배양된 총 175건의 검체 중 증폭산물 자체를 얻는 데 실패한 3건을 제외한 172건에서 모호하거나 비특이적인 결과 없이 균종 수준까지 동정할 수 있었다. 3개의 검체에서 증폭 산물을 얻는 데 실패한 원인은 증폭 전 검체 처리 과정상의 문제로 생각된다.

비결핵항산균의 균종별 분리율에 대한 기존의 국내 보고를 살펴보면 서울 지역에서 수행된 연구[7]의 경우 앞서 언급한 세가지 균 외에 *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. gordonae* 등이 높은 분리율을 보였고, 울산 지역에서 수행된 연구[12]에서는 오히려 *M. kansasii*와 *M. gordonae*가 가장 흔했다(Table 3). 물론 문헌에 따라 동정이 불분명한 예가 포함되어 있고, 균 동정에 사용된 방법이 상이한 것을 감안하더라도, 각 연구 간의 차이는 비결핵항산균의 지역적 분포의 차이를 반영하는 것으로 생각할 수 있다. 연구 간 분리율의 차이가 큰 균 중 *M. gordonae*는 대표적인 실험실 오염균으로 알려져 있고 임상적 의미가 비교적 적지만, *M. kansasii*의 경우 비결핵항산균 폐질환을 흔히 일으키는 것으로 알려져 있어[4] 균종 간 지역적 분포의 차이에 특히 주목할 필요가 있다.

비결핵항산균 폐질환의 진단에는 영국흉부학회 진단기준[3]과 미국흉부학회 진단기준[4]이 널리 쓰이고 있다. 영국흉부학회의 진단기준에 따르면 도말 양성 여부와는 상관 없이 2회에 걸쳐 동일한 균주가 배양되면 비결핵항산균 폐질환 진단기준을 만족하는 것으로 정의하고 있어, 증상이 없는 환자에서 오염균이나 집락형

성균이 배양된 경우 자칫 비결핵항산균 폐질환으로 잘못 진단할 수 있는 가능성이 있어, 비결핵항산균 폐질환의 이환율이 실제보다 높게 추정되는 단점이 있으므로 본 연구에서는 제외하였다. 미국흉부학회 진단기준의 경우에 임상적, 미생물학적, 방사선학적 소견을 종합하도록 하고 있고, 객담 도말 또는 배양 검사가 3회 이상 양성소견을 보여야 하므로, 환자가 아닌 사람을 환자로 잘못 진단할 가능성이 낮은 장점이 있다. 그러나, 3회 이상의 검사를 시행하지 않은 경우나 항생제 투여를 이미 시작한 경우에는 임상적으로 명백한 비결핵항산균 폐질환일지라도 진단을 할 수 없는 단점도 있다.

본 연구에서 3회 미만의 검사를 시행하여 미국흉부학회 진단기준의 요구 사항을 만족시키지 못한 증례를 살펴보면, 대부분이 10개 미만의 집락이 검출되어 임상적으로 오염균이나 집락형성균으로 생각하고 더 이상의 추적 검사를 하지 않은 경우에 해당하여 실제 비결핵항산균에 의한 폐질환의 가능성은 낮아 보인다. 특히 *M. avium*의 경우 균이 한번이라도 분리된 49명의 환자 중 진단기준의 요구사항을 만족시킨 것은 29명에 불과하였다. 또한 3회 이상 검사를 시행하여 요구 사항을 만족하였으나, 양성 횟수가 부족하여 비결핵항산균 폐질환은 아닌 것으로 판정된 증례의 경우 대개 초진 시 항산균에 의한 폐질환을 강력하게 의심하여 항결핵제 치료를 시작한 경우였다. 이 점을 고려하면 실제 비결핵항산균에 의한 폐질환 발생률은 Table 2에 제시된 것보다 높을 가능성이 있다.

본 연구에서 비결핵항산균 폐질환의 원인균으로 *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*가 검출되었다. 이는 *M. fortuitum*에 의한 폐질환이 없는 것을 제외하면 국내의 기존 연구와 대체로 일치하는 결과였다[7, 13]. 한편 Table 2에서 보는 바와 같이 *M. avium*의 비결핵항산균 폐질환 발병률이 다른 두 균에 비하여 낮은 것으로 나타났는데, 통계학적인 유의성은 없었으나 이 점에 대하여 향후에 추가적인 연구가 필요하리라 생각한다.

비결핵항산균에 의한 질환의 치료 방침은 균종에 따라 많은 차이가 있다. *M. avium* complex의 경우 1차 항결핵제(rifampin, ethambutol, isoniazid)와 clarithromycin 같은 macrolide 계열 항생제를, *M. abscessus*의 경우 amikacin, cefoxitin, imipenem 등을 치료에 사용하도록 권고하고 있다[3, 4]. 따라서 비결핵항산균 질환을 적절하게 치료하기 위해서는 무엇보다 균종 수준의 정확한 동정이 이루어져야 한다. 특히 결핵 유병률이 높은 우리나라의 경우, 일반적으로 항산균 도말 검사 양성이면 결핵으로 간주하여 치료를 시작하므로[23], 항산균 배양을 통해 정확한 균종을 동정하는 것이 치료 실패를 줄이는 데 매우 중요하다.

뇌척수액 검체에서 *M. mucogenicum*과 *M. pulveris*가 각각 1명에서 검출되었는데, 집락수가 상대적으로 적고 임상적인 경과와도 관련이 없어서, 오염균일 가능성이 높다. 조직 검체에서는 피부 감염과 만성 골수염 조직에서 *M. abscessus*가 2건 분리되었는데, 일반 세균에 대한 항생제 치료에 반응이 없었고, 비결핵항산균 외 다른 균이 전혀 동정되지 않은 것으로 보아 이들 감염의 원인균으

로 생각된다.

이번 연구를 통해서 AccuProbe 검사와 중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성 분석을 병행하는 경우, 비결핵항산균을 효과적으로 분리하고 균종까지 동정할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 앞으로 지역사회에서 비결핵항산균의 역학적 양상 및 각 비결핵항산균 균주에 따른 질환 발생률에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

배경 : 최근 국내 검사실에서 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)의 분리와 관련 질환의 빈도가 증가하고 있으나, 비결핵항산균에 대한 전체적인 분리 양상이나 균 수준까지 동정하는 연구는 많지 않았다. 따라서, 본 연구는 한 병원 검사실에 의뢰된 항산균 검사에서 비결핵항산균의 분리와 균종 동정, 그리고 항산균 배양 검사의 임상적 의미에 대해 알아보고자 하였다.

방법 : 2004년 8월부터 2005년 5월까지 항산균 배양 검사가 의뢰된 검체를 대상으로 배양 양성인 경우, AccuProbe 검사를 통해 결핵균과 비결핵항산균을 구별하였다. 비결핵항산균이 분리된 경우에는 중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성을 이용하여 균종 수준까지 동정하여 그 임상적 의미를 분석하였다.

결과 : 총 2,784명의 환자에서 6,742건의 검체가 의뢰되었고, 항산균 배양 양성은 776개(11.5%)였다. 전체 배양 양성 검체 중 비결핵항산균은 24.4% (189/776)였고, 객담 검체 중에서는 25.3% (169/667)였다. 비결핵항산균 균종 동정을 시도한 175검체 중 172검체에서 총 14종의 비결핵항산균 균주를 동정하였고, 그 중 *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*가 각각 39.0%, 22.7%, 19.8%를 차지하였다.

결론 : 병원 검사실에 의뢰된 항산균 배양 검체로 AccuProbe 검사와 PCR-RFLP 분석을 병행하여 비결핵항산균을 효과적으로 분리하고 균종까지 동정할 수 있었다. 그리고, 비결핵항산균의 분리가 기존의 국내 연구와 비슷한 양상을 보이며, 그 중 일부는 비결핵항산균 폐질환의 원인을 확인하였다.

참고문헌

- Falkinham JO 3rd. Nontuberculous mycobacteria in the environment. Clin Chest Med 2002;23:529-51.
- Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, Gottlieb JE, Scott R, Israel HL, et al. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. N Engl J Med 1989;321:863-8.
- British Thoracic Society. Management of opportunistic mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee Guidelines 1999. Thorax 2000;55:210-8.
- American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med 1997;156(s):1-25.
- Sakatani M. The non-tuberculous mycobacteriosis. Kekkaku 2005;80:25-30.
- Koh WJ, Kwon OJ, Yu CM, Jeon K, Suh GY, Chung MP, et al. Recovery rate of nontuberculous mycobacteria from acid-fast-bacilli smear-positive sputum specimens. Tuberc Respir Dis 2003;54:22-32. (고원중, 권오정, 유창민, 전경만, 서지영, 정만표 등. 항산균 도말양성 객담에서 비결핵성 마이코박테리아의 분리 비율. 결핵 및 호흡기질환 2003;54:22-32.)
- Lee JY, Choi HJ, Lee H, Joung EY, Huh JW, Oh Y, et al. Recovery rate and characteristics of nontuberculous mycobacterial isolates in a university hospital in Korea. Tuberc Respir Dis 2005;58:385-91. (이정연, 최희진, 이해영, 정은영, 허진원, 오연목 등. 한 대학병원에서 비결핵항산균의 분리 및 동정 실태. 결핵 및 호흡기질환 2005;58:385-91.)
- Centers for Disease Control and Prevention. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000;49:593-4.
- 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. (김미나, 이선화, 양성은, 배직현. 국내 3차 및 대학병원에서의 결핵균 검사 실태조사. 대한임상병리학회지 1999;19:86-91.)
- Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease. National survey of mycobacterial diseases other than tuberculosis in Korea. Tuberc Respir Dis 1995;42:277-94. (대한결핵 및 호흡기학회 학술위원회. 비결핵항산균증 전국 실태조사. 결핵 및 호흡기질환 1995;42:277-94.)
- American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1376-95.
- Chung J, Lee SH, Jeong US, Chang CH, Kim SR. Identification of mycobacteria using high performance liquid chromatography in clinical specimens. Korean J Clin Microbiol 2004;7:148-55. (정윤성, 이선호, 정의석, 장철훈, 김성률. 임상검체에서 high performance liquid chromatography법을 이용한 mycobacteria의 동정. 대한임상미생물학회지 2004;7:148-55.)
- Lee HW, Kim M, Shim TS, Bai GH, Pai CH. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients. Tuberc Respir Dis 2002;53:173-82. (이효원, 김미나, 심태선, 배길한, 배직현. 면역적격자에서 비결핵마이코박테리아의 폐감염. 결핵 및 호흡기질환 2002; 53:173-82.)
- Lee JY, Kim M, Chung H, Jun KR, Choi HJ, Lee H, et al. Clinical significance of low-colony count scotochromogen nontuberculous mycobacteria. Tuberc Respir Dis 2005;59:39-46. (이정연, 김미나, 정희정, 전경란, 최희진, 이해영 등. 균집락수가 적은 암색소성 비결핵항산균 배양의 임상적 의미. 결핵 및 호흡기질환 2005;59:39-46.)

15. Park HS, Chin DI, Chong Y, Kwon OH. Effect of N-acetyl-L-cysteine decontamination on the contamination rate of medium and culture positive rate of *Mycobacterium*. Clin Pathol & Qual Control 1991;13:223-7. (박홍식, 진동일, 정윤섭, 권오현. N-acetyl-L-cysteine 오염제거제 사용의 배지 오염율 및 결핵균과 결핵균 이외의 *Mycobacterium* 배양율에 대한 영향. 임상병리와 정도관리 1991;13:223-7.)
16. Nah J, Huh JW, Lee SH, Kim BC, Koh YS, Pai CH. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex using a Gene Probe method. Korean J Clin Pathol 1997;17:71-7. (나준, 허정원, 이성희, 김봉철, 고윤석, 배직현. Gene Probe 법에 의한 *Mycobacterium tuberculosis* complex의 동정. 대한임상병리학회지 1999;17:71-7.)
17. Yi JY, Kim JP, Shin JH, Suh SP, Ryang DW. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* using BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 system - comparison with BACTEC 460 TB system and Ogawa media. Korean J Clin Pathol 2000;20:384-91. (이지연, 김종필, 신중희, 서순팔, 양동욱. BACTEC MGIT 960 System을 이용한 결핵균의 검출 - BACTEC 460 TB system 및 Ogawa 배지와 비교. 대한임상병리학회지 2000;20: 384-91.)
18. 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.
19. Kim HK, Kim YR, Park JP, Kim NH, Ok CH, Jung MH, et al. Isolation of nontuberculous mycobacteria by DNA probe and clinical characteristics of patients with NTM pulmonary disease. Tuberc Respir Dis 2005;58:248-56. (김희규, 김유리, 박정필, 김남희, 옥철호, 정만홍 등. DNA probe를 이용한 비결핵항산균의 분리 및 폐질환자들의 임상적 특징. 결핵 및 호흡기질환 2005;58:248-56.)
20. Cheunoy W, Prammananan T, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: Two amplified targets, *hsp65* and *rpoB*, for identification of cultured mycobacteria. Diag Microbiol Infect Dis 2005;51:165-71.
21. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol 1997;35:2969-73.
22. Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. J Clin Microbiol 2000;38:2966-71.
23. Koh WJ and Kwon OJ. Diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis. Tuberc Respir Dis 2005;58:438-51. (고원중 및 권오정. 폐결핵의 진단과 치료. 결핵 및 호흡기질환 2005;58:438-51.)