

결핵균의 분자역학적 분석 및
유전형에 따른 내성과
임상 특성

연세대학교 대학원
의 과 학 과
최 영 화

결핵균의 분자역학적 분석 및
유전형에 따른 내성과
임상 특성

지도 교수 김 준 명

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

최 영 화

최영화의 박사 학위논문을
인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

시작도 어려웠지만 그 열매는 더욱 더디었습니다. 여러 교수님들의 조언과 도움이 아니었다면 가능하지 않은 일이었습니다. 연구 강사 시절부터 결핵에 대한 관심을 지속하도록 도와주시고 이끌어 주신 조상래 교수님, 주저하고 자신 없어하는 소심함에 용기를 북돋아 주신 용태순 교수님, 아낌없는 지원과 격려를 주신 이경원 교수님께 감사드립니다. 매운 충고와 지적으로 논문 완성에 도움을 주신 장준 교수님, 그리고 무엇보다도 긴 시간 동안 배려해주시고 기다려 주신 김준명 교수님께 감사드립니다. 결핵연구원의 박영길 과장님, 강희운 연구원의 도움과 임상자료의 토대를 주신 호흡기내과 교수님들, 그리고 엄청난 양의 흉부방사선 소견을 검토해 주신 박경주 교수님께 감사드립니다. 사랑하는 가족, 어머니, 상운, 도운, 그리고 남편에게 나의 사랑을 전합니다.

2005년 12월
저자 씀

차 례

| | |
|--|----|
| 국문요약..... | 1 |
| I. 서론..... | 4 |
| II. 재료 및 방법..... | 8 |
| 1. 결핵균의 분자유전형 검사..... | 8 |
| 가. 대상균주..... | 8 |
| 나. IS 6110 유전자의 제한절편 길이 다형성 검사..... | 8 |
| (1) 결핵균 계대배양 및 DNA 분리..... | 8 |
| (2) 제한 효소로 DNA 절단 후 전기영동..... | 9 |
| (3) Southern hybridization 후 화학발광 검출..... | 9 |
| (4) 컴퓨터 분석..... | 10 |
| 다. Spoligotyping..... | 10 |
| (1) DNA 분리 및 PCR..... | 10 |
| (2) 고정된 43 개의 올리고핵산염에 부합 후 화학발광 검출..... | 11 |
| 2. 결핵균의 약제 감수성 검사..... | 12 |
| 3. 결핵환자의 임상 소견 및 방사선 소견..... | 12 |
| 4. 통계분석..... | 13 |
| III. 결과..... | 14 |
| 1. 결핵균의 제한절편 길이 다형성 분석..... | 14 |
| 가. 제한절편 길이 다형성 및 spoligotyping 양상..... | 14 |
| 나. 균주군을 이룬 군의 빈도 및 특징..... | 19 |
| 다. K 균주 (K family)의 빈도 및 특징..... | 21 |
| 2. 결핵균의 감수성..... | 24 |
| 3. Spoligotyping 결과와 임상 및 방사선 소견..... | 25 |
| 가. Spoligotyping 결과..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 나. Beijing 균주와 non-Beijing 균주 감염증의 임상적 차이 | 26 |
| 다. Beijing 균주와 non-Beijing 균주 감염증의 방사선학적 차이..... | 29 |
| 라. Beijing 균주와 non-Beijing 균주 감염증의 치료 결과... | 31 |
| IV. 고찰..... | 32 |
| V. 결론..... | 38 |
| 참고문헌..... | 41 |
| 영문요약..... | 46 |

그림 차례

| | |
|---|----|
| Figure 1. IS6110 Restriction fragment length polymorphism and spoligotyping patterns of 225 <i>M. tuberculosis</i> isolates | 15 |
| Figure 2. IS6110 Restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotyping of 45 isolates with cluster | 20 |
| Figure 3. IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of K family and K1 strain | 22 |
| Figure 4. Representative spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns..... | 25 |

표 차례

| | |
|--|----|
| Table 1. Clinical and demographic findings of clustering patients infected with K1 strain | 23 |
| Table 2. Results of antimycobacterial susceptibility test | 24 |
| Table 3. Comparisons of the clinical findings between Beijing and non-Beijing group | 27 |
| Table 4. Comparisons of the chest radiological findings between Beijing and non-Beijing group diagnosed with pulmonary tuberculosis..... | 30 |

국문요약

결핵균의 분자유전학적 분석 및 유전형에 따른 내성과 임상 특성

결핵균에 대한 분자유전학적 분석 방법들이 개발되면서 접촉자 추적을 통한 역학조사 결과를 실험적으로도 증명할 수 있게 되었으며, 환자에서 분리되는 결핵균의 유전자 조사 자료들이 축적되고 있다. 가장 널리 사용하는 방법은 IS6110을 이용한 제한절편 길이 다형성 (restriction fragment length polymorphism) 검사법이며 이러한 유전형 분석을 근거로 유행을 확인하거나 결핵균의 지역적 특성 및 역사, 전파 흐름 등을 파악하려는 노력들이 있다. 국내에서도 이러한 방법으로 유행을 확인한 바 있으며, 이 분석을 기초로 국내에서 널리 분포하고 있는 K 균주를 확인하였다. 유행하는 결핵 균주에도 지역적 특징이 있으며 중국을 중심으로 아시아 지역에서는 Beijing 균주가 우세하다는 것이 확인되었고, 이들 균주에서 내성 획득이 유리하다는 보고들이 있다. 일부에서는 이러한 내성 획득 능력과 지역적으로 우세하게 된 이유에 대해 전파력이 높은 것, 그 지역의 BCG 예방접종의 영향, 높은 병독성 등을 원인으로 제시하였으나 실제 이들 균주의 임상적 특성을 밝히는 자료는 많지 않다. 이에 결핵균 배양으로 확진된 환자를 중심으로 분자유전학적 분석을 시행하여 최근 감염 및 우세 균주의 특성과 Beijing 균주의 분포를 확인하며, 이들 Beijing 균주에서 약제 내성을 비롯한 임상 특성을 살펴 아시아에서 우세하게 된 이들 균주의 기전을 이해하는데 기초 자료로 삼고자 하였다. 이와 같은 연구로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 225건의 분석에서 197개의 제한절편 길이 다형성 양상을 보였다. 제한절편 길이 다형성에서 IS6110 띠가 동일한 균주군 (cluster) 16개 군 41건(18%)을 확인 하였다. 방사선 소견이나 임상 소견에서는 양 군 사이에 차이가 없었다.
2. 국내 균주의 제한절편 길이 다형성 분석에서 가장 많은 빈도를 보이는 유전자형인 K 균주는 34건 (15.1%)에서 확인되었다. 균주군을 이루는 41건 중 9건에서 동일 K1 균주에 의한 균주군이 관찰되었다.
3. 약제 감수성 결핵균 185건 (84.9%), 하나의 약제에도 내성인 결핵균 33건 (15.1%), isoniazid와 rifampin을 포함한 여러 약제에 내성인 다제 내성균 12건 (5.5%)을 확인하였다.
4. Spoligotyping 결과 Beijing 균주는 154건으로 69.4% 였다. Beijing 균주와 non-Beijing 균주 사이에 성별, 나이, 이전의 치료력, 가족력, 임상 증상 등에서 차이가 없었다. Beijing 균주에 감염된 환자에서 체질량 지수가 낮았고, 폐외결핵을 단독으로 보이는 경우가 적고, 폐결핵이나 폐결핵을 동반한 폐외결핵의 양상으로 나타났다. 치료 과정 중 발열이나 기존 질환의 악화를 보이는 역설반응이나 치료 결과에서 양 군 사이에 차이가 없었다. 약제 내성에서는 Beijing 균주가 내성률이 높았으며, 특히 isoniazid 내성률이 높았다.

5. 폐결핵을 보이는 환자를 대상으로 방사선 소견을 분석하였으며, 침범하는 폐부위와 범위, 폐병변의 양상, 흉수, 림프절 종대 등에서 Beijing 균주와 non-Beijing 균주 사이에 차이가 없었다.

6. Beijing 균주와 non-Beijing 균주의 치료 결과에 차이는 없었으며, 다중 회귀 분석에서 재발이나 치료 실패, 사망에 이르는 나쁜 예후와 관련된 인자는 한쪽 폐야를 넘는 광범위한 폐침윤 (OR 4.11, $P=0.025$), 흡연기간 (OR 1.03, $P=0.04$), 다제내성 (OR 6.09, $P=0.058$)이었다

본 연구의 결과로 균주군을 이루는 감염 18%를 확인하였으며, 국내에서 우세한 결핵균인 K 균주를 15%에서 확인하였다. 아시아 지역을 중심으로 확산되고 있는 Beijing 균주가 non-Beijing 균주와 비교하여 임상 증상이나 방사선 소견, 치료 결과에서는 차이가 없었으나 폐외결핵을 단독으로 보이는 경우는 적고 폐결핵이나 폐결핵을 동반한 폐외결핵의 양상으로 나타났다. Beijing 균주 환자에서 체질량 지수가 낮아 병독성이 좀 더 높을 가능성을 시사하였으며, non-Beijing 균주에 비해 내성률이 높았다. 이러한 결과로 Beijing 균주는 좀 더 용이한 내성 획득 능력을 가지고 있고, 병독성이 높을 가능성을 제시하였으나 이의 확인에는 향후 좀 더 많은 임상 자료가 축적되어야 할 것으로 사료되었다.

핵심되는 말 : 결핵, 유전형, 분자역학, 내성, Beijing 균주

결핵균의 분자역학적 분석 및 유전형에 따른 내성과 임상 특성

지도교수 김 준 명

연세대학교 대학원 의과학과

최 영 화

I. 서론

전세계의 연간 결핵 발생 수는 850만 명 (인구 10만 명 당 결핵발생률 138명)으로 추정되며, 이 중 도말 양성 결핵 환자는 375만 명 (인구 10만 명 당 결핵 발생률 61명)으로 발표되어 있다.¹ 우리나라에서는 1962년에 국가 결핵 관리 체계를 수립하고 이후로 1965년 전국 결핵 실태조사 결과 5.1%의 결핵 유병률을 1995년 조사 결과에서 1%로 감소시키는 괄목할 만한 성과를 거두었다. 이는 높은 경제 성장 및 국민생활의 질적 향상과 더불어 의료보험제도가 확대 실시되면서 의료 이용률이 증가하는 등 보건 환경이 양적, 질적으로 개선되고 1990년 이후 6개월 단기 요법이 확립되면서 국가 결핵 관리 사업 체계 내에서 치료 효율이 크게 향상된 것이 중요한 역할을 한 것으로 생각되고 있다.² 이처럼 과거에 높았던 결핵 유병률이 감소한 것은 사실이나 현재도 선진국에 비하여 발생률이 높고 젊은 연령에서 계속 발생하고 있는 것은 지역 사회에서 지속적인 전파가 일어나고 있다는 것을 의미한다. 현재 환자의 결핵 발병이 과거 감염의 재활성화인지 최근

감염인지에 대해서는 환자의 병력과 결핵 감염자와의 접촉 경로를 추적하는 것이 기본적이거나 이는 상세한 역학조사가 필요하며 접촉자 전체를 추적해야 하는 바 민감도가 떨어진다. 1990년대 결핵 균주에 대한 분자유전학적인 방법들이 개발되면서 이러한 접촉자 추적을 통한 역학조사 결과를 실험적으로 증명해 내었으며 이후 결핵균의 유전자 조사 자료들이 축적되고 있다.^{3,4,5}

결핵균의 분자유전학적 특성을 살피는 방법은 여러 가지가 시도되었으나 결핵균 유전자의 삽입서열 (insertion sequence; IS)6110을 이용하여 제한절편 길이 다형성 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) 검사를 시행하는 것이 변별력이 우수하여 표준 방법으로 널리 사용되고 있다.⁶ 결핵균 DNA염기 서열 중에는 IS6110이 불규칙하게 삽입되어 있는데 그 수와 위치가 균주에 따라 다르고, 같은 균주 안에서는 배양을 하더라도 그 안정성이 유지되기 때문에 IS6110을 이용하여 제한절편 길이 다형성 검사를 하면 같은 균주인지 다른 균주인지 확인할 수 있다.^{3,7} 재활성화에 의한 발병인 경우에 나타나는 유전자형은 자신이 오래 전부터 가지고 있던 균에 의한 발병이므로 비슷한 시기에 발병한 다른 사람의 결핵균과 유전자형이 동일하지 않으며 최근에 누군가로부터 감염되어 발병한 경우에는 이들 균에서 동일한 유전자형을 가지게 된다. 따라서 병원에서 결핵 환자와 접촉한 후 발생한 원내 감염 결핵이나 어느 지역에서 갑자기 발생한 유행의 흐름을 동일 유전자형을 확인함으로써 알 수 있게 된다. 또는 이전에 결핵으로 치료 받았던 환자가 다시 발병한 경우 대개는 재발로 생각하나 유전자형 분석으로 이전의 결핵균과 다름을 증명하여 동일 균에 의한 재발이 아니라 재감염임을

증명하기도 하고 실험실내 교차오염이나 내성 양상이 다른 균이 분리되었을 때 같은 균에서 치료 중 내성을 획득했는지 다른 균에 감염된 것인지 확인할 수도 있다.^{8,9} 이러한 유전형 분석을 근거로 유행을 확인하거나 전파 경로를 확인함으로써 전파 방지를 위한 방안을 세우는데 도움이 될 수 있다. 국내에서도 이러한 방법으로 고등학교 내에서 폐결핵 환자를 중심으로 유행을 확인한 바 있으며 이 분석을 기초로 국내에서 널리 분포하고 있는 K 균주를 확인하였다.¹⁰ 이에 본 연구자는 이러한 단체를 대상으로 한 유전형 분석을 넘어 지역 사회에서의 유전형 분석을 통해 어느 유전형이 분포하고 있으며 동일 균주에 의한 최근 감염은 얼마나 발생하고 있는지 알아보고자 하였다.

제한절편 길이 다형성 검사를 이용한 유전형 분석은 변별력이 우수해 표준법으로 사용하고 있지만 다량의 DNA가 필요하여 결핵균을 수 주간 계대 배양해야 하며, 결과에서 지표가 되는 유전자의 띠가 적은 경우는 동일 균주인지 다른 검사법을 이용한 확인이 필요하다. 다른 방법으로는 spoligotyping을 이용할 수 있으며 결핵균이 10-50 카피 정도 가지고 있는 36 bp 크기의 direct repeat(DR) 영역 사이 사이의 (spacer) 올리고핵산염을 분석하는 방법이다. 이 방법은 제한절편 길이 다형성 검사에 비하여 변별력은 떨어지나 임상 검체를 바로 이용할 수 있고 간단하다는 장점이 있다.^{6,11,12} 이러한 spoligotyping을 이용하여 동일 양상의 특정 균주가 일부 지역에서 우세하게 확산 되어 있음을 알게 되었으며 이 균주가 주로 Beijing에서 분리된 것이어서 Beijing 균주라고 하였다.¹³ 이후 여러 연구에서 이 균주가 중국을 중심으로 한 아시아 지역과 일부 러시아에서는 70% 이상으로 우세하게

분포하나 아프리카나 유럽, 아메리카에서는 0-30%로 적은 비율로 분포함이 보고되었으며 일부 자료에서는 이들 균주에서 약제 내성률이 높다고 알려졌으나 상반된 결과들도 보고되었다.^{14,15,16,17,18,19} 일부에서는 이러한 내성 획득 능력과 전파력이나 높은 병독성이 이들 균주가 우세하게 된 원인일 것이라고 제시하였으나,^{9,20,21,22} 실제 이들 균주의 임상적 특성을 밝힌 자료는 많지 않다. 이에 결핵균 배양으로 확진된 환자를 중심으로 분자유전학적 분석을 시행하고 최근 감염의 빈도 및 우세 균주의 특성을 살펴보고 Beijing 균주의 분포를 확인하며 이들 Beijing 균주에서 약제 내성을 비롯한 임상적 특성을 살펴 아시아에서 우세하게 된 이들 균주의 특성을 이해하는데 기초 자료로 삼고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 결핵균의 분자유전형 검사

가. 대상균주

2001년 1월부터 2003년 6월까지 아주대학교 병원에서 동정된 결핵균 중 계대 배양이 가능하였던 225 균주를 대상으로 하였다. 표준 균주는 결핵연구원의 *M. tuberculosis* K1 균주로 하였다.

나. IS6110 유전자의 제한절편 길이 다형성 검사

(1) 결핵균 계대배양 및 DNA분리

Lowenstein-Jensen 배지에 4주 간 배양하고 chromosomal DNA를 분리 하였다.⁷ 임상 균주와 표준 균주를 1 루프 이상을 취하여 TE 완충액 400 μ l(0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA[pH 8.0])와 혼합하여 80°C에서 20분간 사멸 하였다. 10 mg/ml lysozyme 50 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 두었다. 10% sodium dodecyl sulfate 70 μ l와 proteinase K 5 μ l(10 mg/ml)를 넣고 혼합액을 65°C에서 10분간 두었다. 5 M NaCl 100 μ l와 N-acetyl-N, N, N,-trimethyl ammonium bromide 100 μ l를 넣고 밀키화 시킨 후 65°C에서 10분간 방치하였다. Chloroform-isoamyl alcohol(24:1;vol/vol)을 750 μ l를 넣고 10초 동안 혼합하고 5분간 원침한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 후 isopropanol 450 μ l를 넣고 DNA를 침전시켰다. 영하 20°C에서 30분간 식힌 후 15분간 원침하고 침전물을 70% alcohol로 1회 씻어내었다. 공기 중에서

말린 침전물을 1x TE 완충액 (0.001 M Tris-HCl, 0.0001 M EDTA[pH 8.0])으로 용해 시켰다.

(2) 제한효소로 DNA 절단 후 전기영동

Emlden JD⁴ 등의 표준 방법에 따라 DNA 지문검사를 시행하였다. Chromosomal DNA를 *Pvu*II로 분해한 후 90 mM Tris base, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA를 함유한 0.8% agarose gel에 16시간 동안 pulsed-field gel electrophoresis(2.5 V/cm, 1.5 forward /backward)하였다.

(3) Southern hybridization 후 화학발광 검출

분리된 DNA는 vacuum transfer device(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 양이온으로 하전된 나일론 막 (Hybone N+;Amersham Biosciences, Amersham, United Kingdom)에 옮기고, 라벨된 DNA 탐색자의 repetitive elements에 대해 부합한 후 결합된 탐색자는 chemiluminescence direct nucleic acid detection system(Amersham Biosciences, Amersham, United Kingdom)으로 찾아내었다. IS6110 탐색자는 320 bp로 *M. tuberculosis* K1 표준 균주의 right arm sequence에 대한 PCR 증폭 탐색자이며 IS6110 탐색자에 대한 길잡이는 올리고핵산염인 INS-1(5'-CCGGTTAGGTGCTGGTGG-3')과 INS-2(5'-CGCCCCATCGACCTACTACG-3')을 사용하였다.³

(4) 컴퓨터 분석: K1 균주의 제한절편 길이 다형성 양상이 동일한지 확인하고 이를 기준으로 다른 균주들의 제한절편 길이 다형성 양상을 확인한다. 컴퓨터 비교 프로그램 GelCompar II(Applied Maths, Kortrijk, Belgium)를 이용하였다. 균주군은 동일한 제한절편 길이 다형성 양상을 보이는 균주가 두 개 이상 동정된 것으로 정의하였다. K 균주는 염색체 내 IS6110 띠가 8-12개이면서 K1 균주와 비교 시 IS6110 띠 중에서 5개 이상이 같은 위치에 있으면서 비교 프로그램 (Gel Compare II)으로 K1 균주와의 비슷한 정도를 비교하였을 때 70% 이상 동일한 균주로 정의하였다.

다. Spoligotyping

(1) DNA 분리 및 PCR: 앞서서와 같은 방법으로 DNA를 추출하고 Kamerbeek 등²³의 방법으로 PCR을 시행하였다. PCR을 위한 혼합물을 50 μ l 준비하였다. PCR 완충액, 각 deoxynucleoside triphosphate 10 pM, primer DRa(GGTTTTGGGTCTGACGAC, 5' biotinylated), DRb(CCGAGAGGGGAC-GGAAAC) 각각 10 pM, DNA 10 ng, D-Taq DNA polymerase 0.5 U(HT Biotechnology Ltd., Cambridge, United Kingdom) 혼합물을 96°C에서 3분간 가열한 후 96°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 30초 동안 35회의 중합효소반응을 시행하였다.

(2) 고정된 43개의 올리고핵산염에 부합 후 화학발광 검출: 증폭 결과물을 43개의 올리고핵산염을 결합시킨 막에 부합시켰다. 막 (Biodyne C: Pall Biosupport, Portsmouth, United Kingdom)은 miniblotted 시스템을 사용하여 (MN45: Immunetics, Cambridge, MA, U.S.A.) 수평으로 나란히 고정하고 16%(wt/vol) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide로 활성화 시켰다. 잠시 후 100 mM NaOH로 비활성화하고 0.1% sodium dodecyl sulfate를 넣은 2x SSPE(1x SSPE는 0.18 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA[pH 7.7]:Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A.)로 씻어냈다. 부합을 위해 PCR 결과물 50 μ l를 부합완충액 150 μ l로 희석하고 열을 가하여 변성시키고 희석된 검체 130 μ l를 고정된 올리고핵산염 줄에 수직이 되게 넣어주었다. 60°C에서 60분간 부합하고 막을 2x SSC-0.5% SDS 250 ml로 60°C에서 10분씩 두차례 씻어내고 1:4,000으로 희석된 streptavidin-peroxidase conjugate를 넣고 42°C에서 45-60분 동안 놓아두었다. 막을 2x SSPE-0.5% SDS 250 ml로 42°C 에서 10분씩 두차례 씻어내고 상온에서 5분간 2x SSPE 250 ml에 담갔다. 부합된 DNA를 검출하는데 화학발광검출액 (chemiluminescent ECL detection liquid) (Amersham Biosciences, Amersham, United Kingdom)을 사용하였고 엑스레이 필름 (hyperfilm ECL: Amersham Biosciences, Amersham, United Kingdom)에 노출시켰다.²⁴ Beijing

균주는 특징적으로 1에서 34번의 올리고핵산염에는 반응을 보이지 않으나 35번에서 43번까지의 올리고핵산염에는 반응을 보이는 것으로 하였다.

2. 결핵균의 약제 감수성 검사

Lowenstein-Jensen 배지에 배양하면서 12가지 약제에 대한 감수성 검사를 결핵연구원에서 시행하였다.²⁵ 각 약제의 농도는 isoniazid 0.2 µg/ml, rifampin 40 µg/ml, streptomycin 4 µg/ml, ethambutol 2 µg/ml, kanamycin 4 µg/ml, ethionamide 40 µg/ml, cycloserine 30 µg/ml, para-aminosalicylic acid 1 µg/ml, ofloxacin 2 µg/ml, capreomycin 40 µg/ml, enviomycin 40 µg/ml로 하였다. 대조배지 균 집락 수와 비교하여 1% 이상의 균이 발육 시 각 약제에 내성인 것으로 판정하였다. 피라지나마이드는 pyrazinamidase 검사로 내성 여부를 결정하였다.

3. 결핵 환자의 임상 소견 및 방사선 소견

결핵균이 확인되어 진단된 환자를 대상으로 하였으며 분자역학적 연구가 가능하였던 225예의 임상기록을 후향적으로 검토하였다. 방사선 소견은 영상의학과 전문의가 판독하였으며 진단 당시의 흉부방사선 소견을 병변의 양상, 병변 부위, 범위 등을 판독하였다.

(1) 기초자료 조사: 성별, 체질량 지수 (Body mass index), 흡연력, 질병력 (폐질환, 간질환, 당뇨, 술중독), 과거 결핵치료력, 가족력

- (2) 임상증상: 발열, 체중감소, 호흡곤란, 객혈, 기침, 객담, 증상기간
- (3) 실험실 검사소견: 백혈구 수, 호중구 수, 림프구 수, 혈소판, 혈색소, albumin, AST/ALT, 객담도말 양성 유무 및 AFB 밀도, Na/Ca
- (4) 흉부 방사선소견: 병변 부위와 범위, 공동, 흉수, 림프절 종대 및 부위, 무기폐 유무 및 방사선 양상 (경화, 결절 크기, 속립성 등)
- (5) 임상진단: 폐결핵, 폐외결핵, 폐결핵을 동반한 폐외결핵
- (6) 치료 결과: 치료 중 역설반응, 약물 부작용, 치료 결과 (완치, 재발, 치료실패), 치료 후 추적기간

4. 통계분석

Beijing 균주와 non-Beijing 균주에 대해 각각의 변수에 대해 명목변수에 대해서는 카이제곱 검정, 연속변수에 대해서는 Student's t검정을 하였으며 치료 결과와 관련이 있는 인자 분석에 다중 회귀분석을 이용하였다.

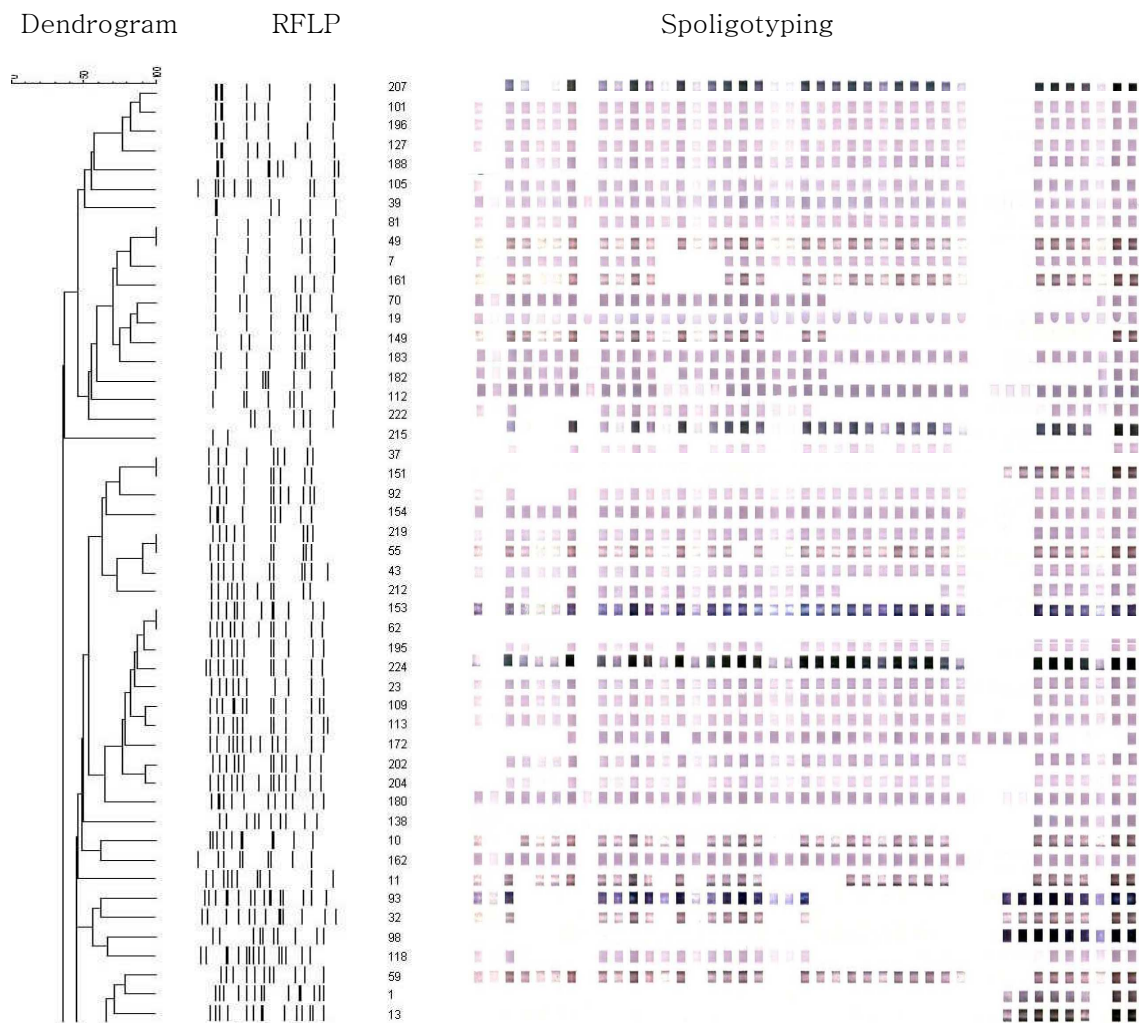
III. 결과

1. 결핵균의 제한절편 길이 다형성 분석

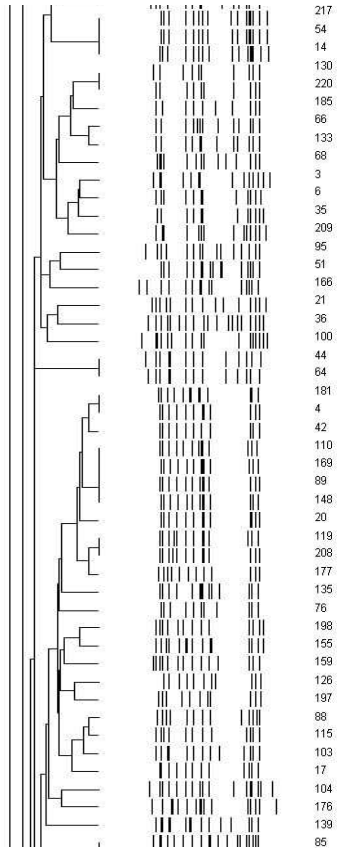
가. 제한절편 길이 다형성 및 spoligotyping 양상

225건의 분석에서 197개의 제한절편 길이 다형성 양상을 보였다 (Figure 1). 제한절편 길이 다형성 양상은 띠가 10, 11, 12, 13개인 균주가 가장 많아 116건 (51.5%)이었다.

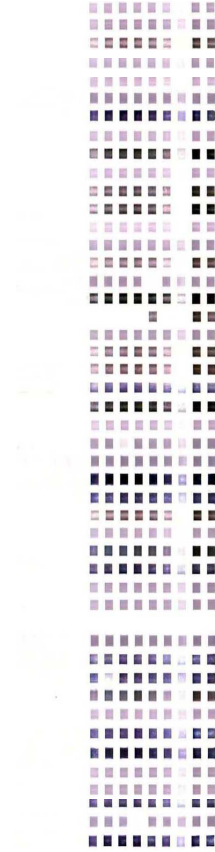
Figure 1. IS6110 restriction fragment length polymorphism and spoligotyping patterns of 225 *M. tuberculosis* isolates



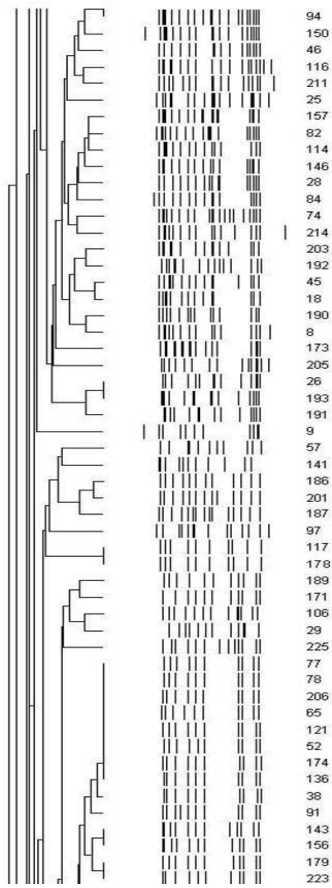
Dendrogram RFLP



Spoligotyping



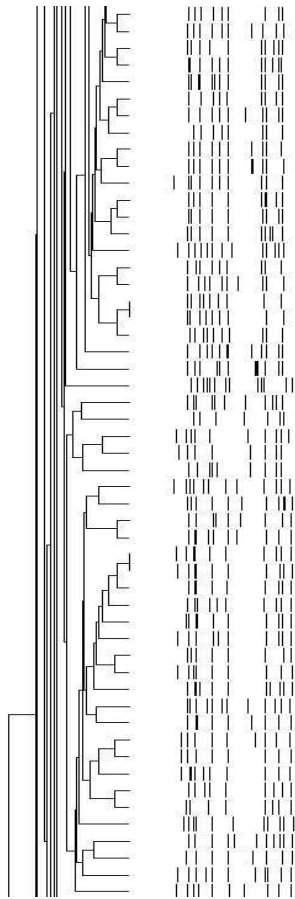
Dendrogram RFLP



Spoligotyping

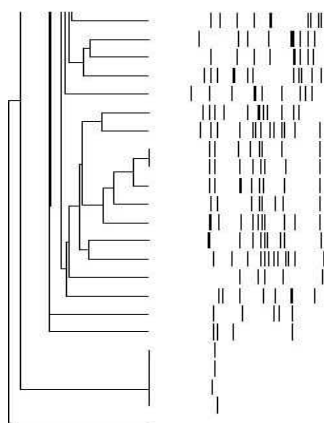


Dendrogram RFLP

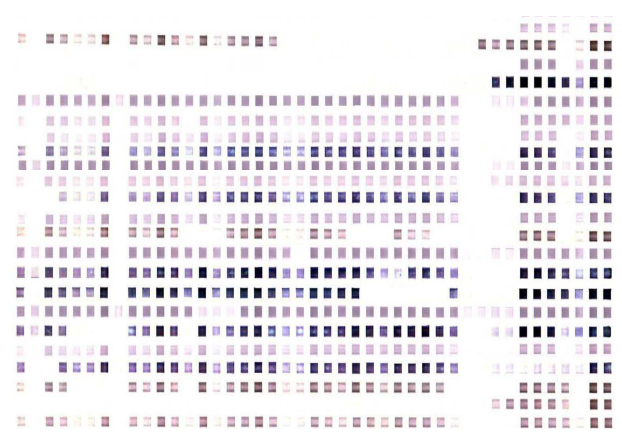


- 87
- 210
- 221
- 163
- 75
- 99
- 22
- 31
- 41
- 132
- 15
- 24
- 164
- 102
- 48
- 27
- 111
- 71
- 168
- 170
- 2
- 63
- 83
- 122
- 147
- 72
- 200
- 79
- 5
- 167
- 61
- 142
- 125
- 69
- 90
- 131
- 30
- 50
- 137
- 120
- 134
- 218
- 199
- 145
- 60
- 107
- 140
- 216
- 129
- 16
- 12
- 144
- 160

Spoligotyping



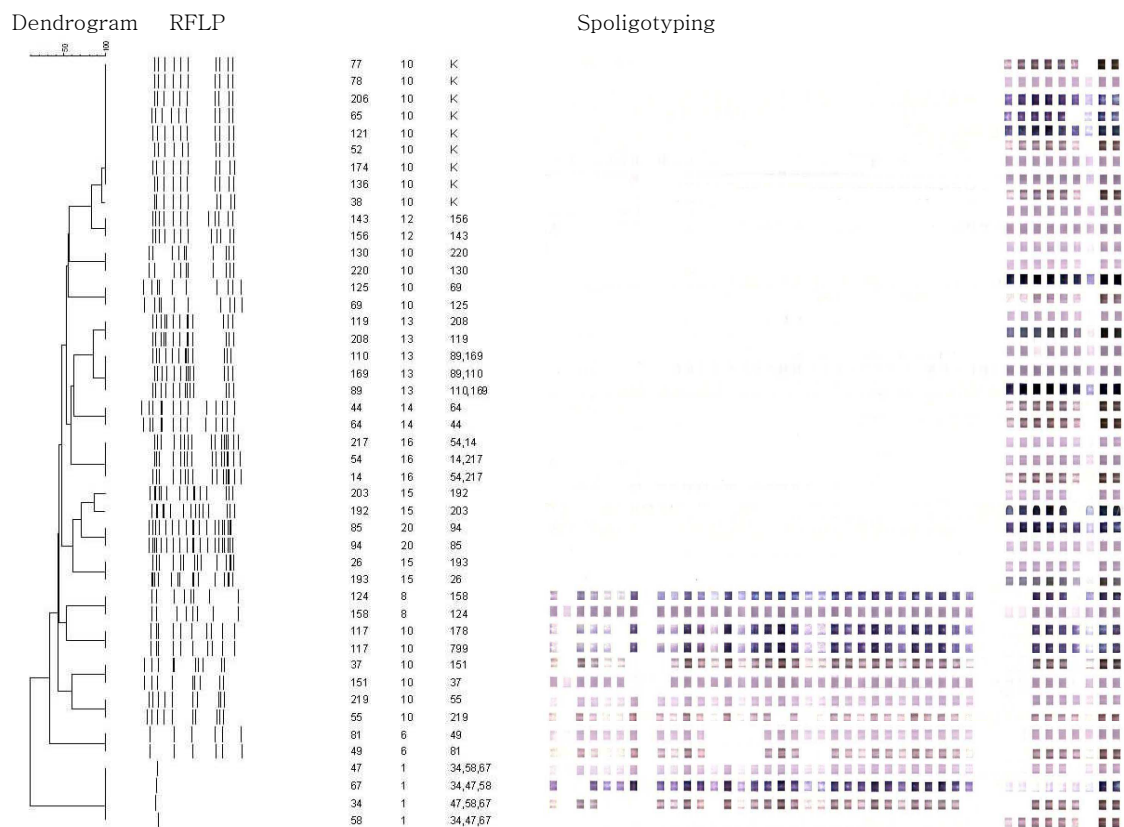
- 213
- 53
- 152
- 108
- 184
- 80
- 194
- 124
- 158
- 96
- 123
- 33
- 40
- 165
- 86
- 128
- 175
- 73
- 47
- 67
- 34
- 58
- 56



나. 균주군 (cluster)을 이룬 균의 빈도 및 특징

제한절편 길이 다형성 양상이 동일한 균주군이 17개 균 45건 (20%)에서 나타났다. 2 명씩 균을 이룬 13 개의 균주군과, 3 명씩 균을 이룬 2 개의 균주군, 4 명, 9 명이 균을 이룬 균주군을 각각 확인하였다 (Figure 2). 그러나 제한절편 길이 다형성 분석의 단점이라고 할 수 있는 IS6110 유전자 띠가 6개 미만인 균에서 변별력을 고려할 때, 띠가 하나인 4건의 균주는 spoligotyping 결과 동일 양상으로 나타나지 않아 같은 균주로 보기 어려워 균주군에서 제외하였다. 띠가 한개인 균주는 *M. bovis*를 의심해 볼 수 있으나 배양에서 모두 결핵균으로 확인되었고 *M. bovis*는 spoligotyping에서 39번에서 45번까지 반응을 보이지 않는 점을 볼 때 *M. bovis*가 아님을 알 수 있었다. 이로써 균주군을 이룬 것은 16개 균주군 41건 (18%)으로 확인하였다. 균주군을 이룬 균과 그렇지 않은 균에서의 방사선 소견, 임상 소견에서는 양 균 사이에 차이가 없었다.

Figure 2. IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotyping of 45 isolates with cluster



다. K 균주 (K family)의 빈도 및 특징

국내에서 제한절편 길이 다형성 분석상 가장 많은 빈도를 보이는 유전자형인 K 균주는 34건 (15.1%)에서 확인되었다 (Figure 3). K1 균주는 9건 (4%)이었다. K 균주와 K 균주가 아닌 균들 사이에 임상적, 방사선학적 차이는 없었다. 균주군을 이루는 41건 중 9건에서 동일 K1 균주에 의한 균주군을 이루는 소견이 관찰되었다. 이들 9건에 대한 진단, 진단 시기, 역학적 특성에 대하여 검토하였다 (Table 1). 9건 중 5건에서 과거에 앓은 병력이 있었으며 6건은 약제 감수성 결핵균이었으나 2건은 isoniazid 내성, 1건은 streptomycin 내성을 보였다. 유전자 검사로는 이들이 모두 동일 균주에 의한 감염으로 나타났으나 내성 양상이 일부 다르고 다수의 환자에서 과거 감염의 병력이 있어 최근 감염으로 확인하기 어려우며 접촉자 조사와 같은 역학연구가 추가되어야 할 것으로 생각되었다.

Figure 3. IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of K family and K1 strain

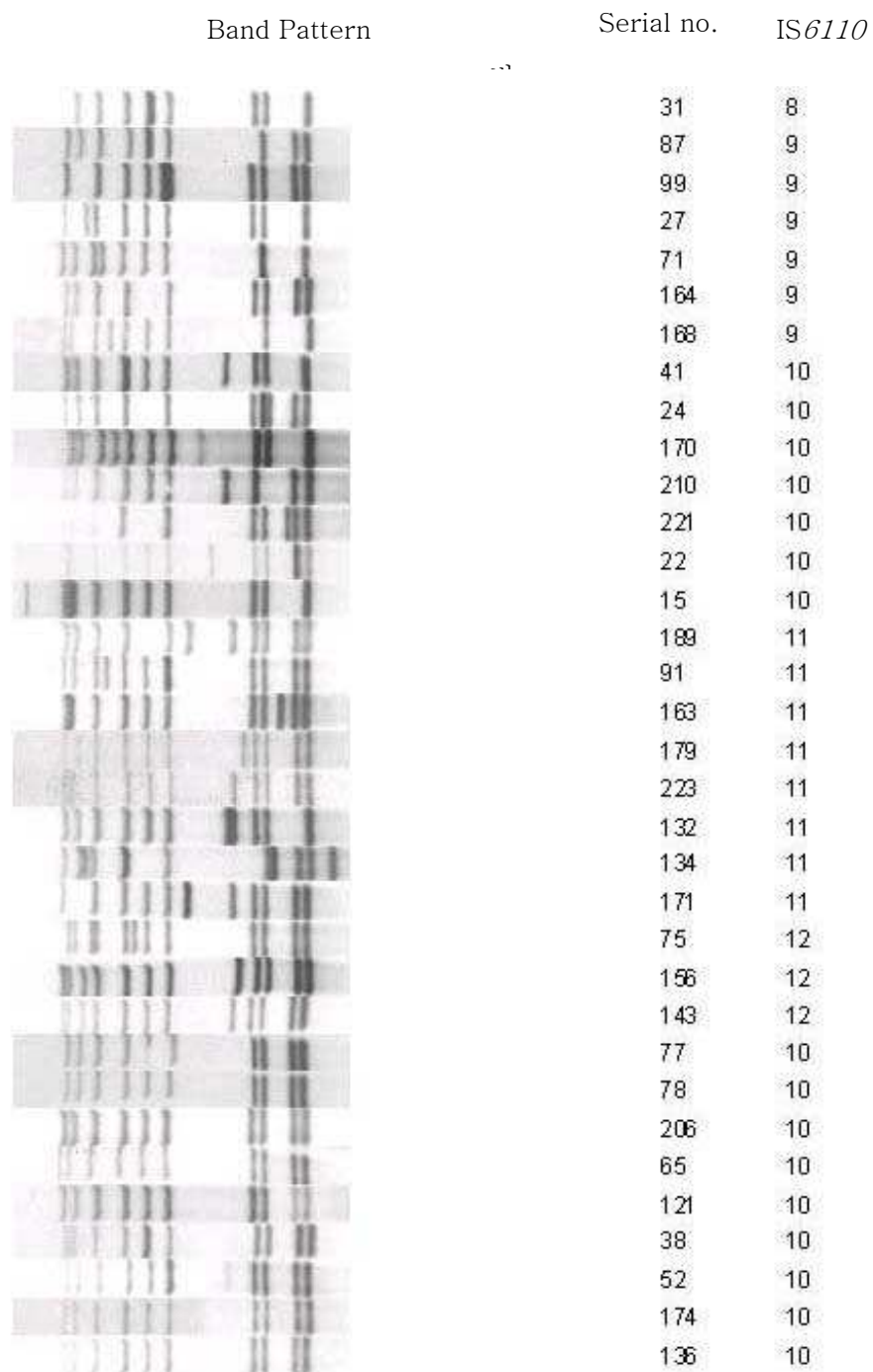


Table 1. Clinical and demographic findings of clustering patients infected with K1 strain

| Serial No. | Sex/age | Diagnosis | Time of Dx | AFB smear | Previous treatment | Family Hx | Resistance | Place of residence |
|------------|---------|-------------------------------|------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|--------------------|
| 38 | F/56 | Tb spine +pulmonary Tb | 2001.4 | - | 35 yrs ago | no | INH [†] + | Pocheon |
| 52 | F/29 | pulmonary Tb+anal fistula | 2001.12 | ++ | 1996 yr 1mo. | yes | DSTB* | Suwon |
| 174 | M/60 | pulmonary Tb+pleurisy | 2002.3 | - | 18 yrs ago 6 mo. | unknown | DSTB | Suwon |
| 77 | M/24 | pulmonary Tb | 2002.5 | + | - | unknown | DSTB | Suwon |
| 78 | F/38 | pulmonary Tb+Tb lymphadenitis | 2002.6 | - | - | yes | SM [‡] + | Suwon |
| 206 | M/67 | pulmonary Tb | 2002.9 | +++ | 2001 yr 6 mo. | unknown | INH+ | Pyeongteak |
| 136 | M/68 | pulmonary Tb+pleurisy | 2002.9 | ++ | - | no | DSTB | Yongin |
| 65 | M/73 | pulmonary Tb+destroyed lung | 2002.12 | +++ | 40 yrs ago | yes | DSTB | Suwon |
| 121 | M/20 | Pulmonary Tb | 2003.2 | + | - | unknown | DSTB | Yongin |

*DSTB:drug sensitive *M. tuberculosis*

[†]INH:isoniazid

[‡]SM:streptomycin

2. 결핵균의 감수성

218건의 감수성 검사를 시행하였으며 약제 감수성 결핵 185건 (84.9%), 하나라도 내성인 결핵균 33건 (15.1%), isoniazid와 rifampin을 포함한 여러 약제에 내성인 다제 내성균 12건 (5.5%) 등을 확인하였다. 다제 내성균이 동정된 환자에서 이전에 치료력이 없는 환자에서 발생한 초치료 내성은 2건 (16.7%) 이었다 (Table 2).

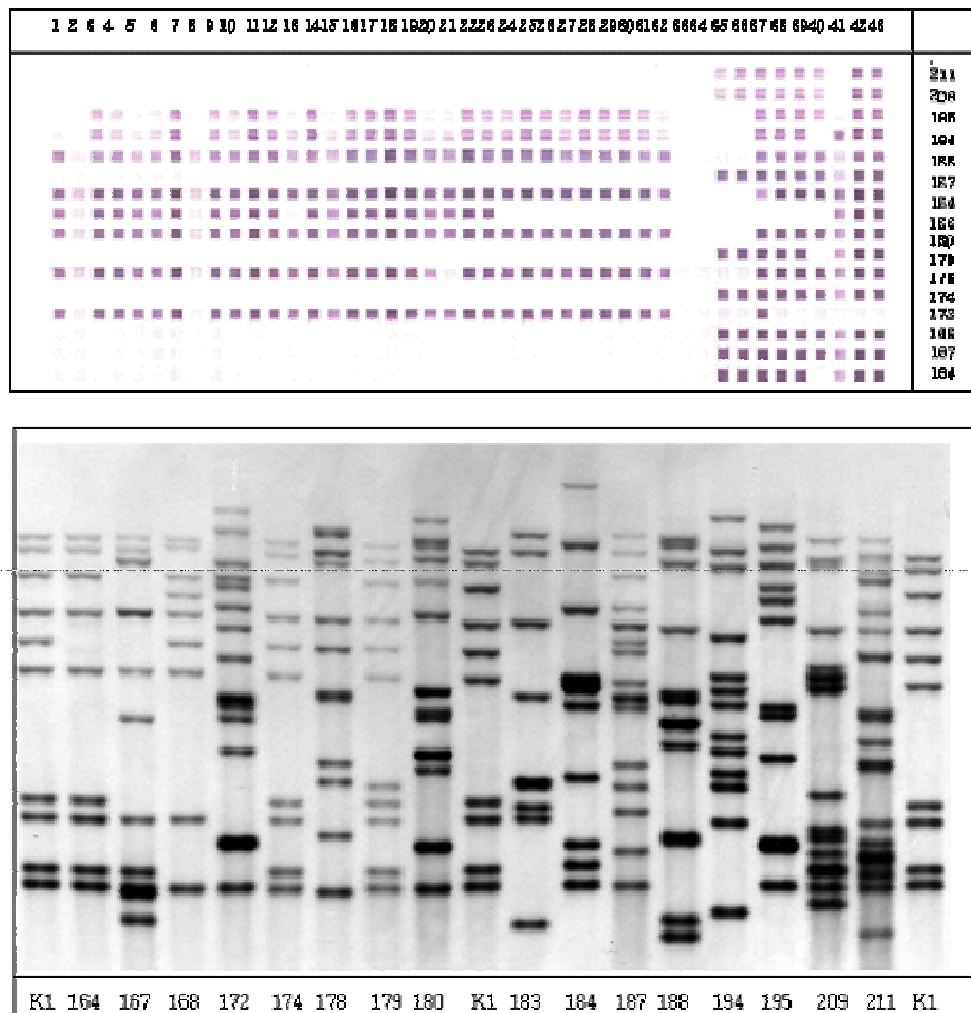
Table 2. Results of antimycobacterial susceptibility test

| Drug | Tested No. | Resistance No.(%) |
|----------------------|------------|-------------------|
| Isoniazid+rifampin | 218 | 12 (5.5) |
| Isoniazid | 218 | 29 (13.3) |
| Rifampin | 218 | 12 (5.5) |
| Streptomycin | 218 | 8 (3.7) |
| Ethambutol | 218 | 15 (6.9) |
| Kanamycin | 218 | 2 (0.9) |
| Ethionamide | 218 | 3 (1.4) |
| Cycloserine | 218 | 2 (0.9) |
| Paraaminosalicylates | 218 | 7 (3.2) |
| Ofloxacin | 218 | 7 (3.2) |
| Enviomycin | 163 | 2 (3.2) |
| Capreomycin | 154 | 2 (1.3) |
| Pyrazinamide | 218 | 15 (6.9) |

3. Spoligotyping 결과와 임상 및 방사선 소견

가. Spoligotyping 결과: 222건의 검체로 시행한 결과 Beijing 균주는 154건으로 69.4%였다. 일부 균주의 제한절편 길이 다형성과 spoligotyping 결과를 그림에 나타내었다 (Figure 4).

Figure 4. Representative spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns



나. Beijing 균주와 non-Beijing 균주 감염증의 임상적 차이

Beijing 균주와 non-Beijing 균주 사이에 성별, 나이, 이전의 치료력, 가족력의 차이는 없었다. 균주군을 이루는 비율에서도 차이가 없었으며 발열, 체중감소, 가래, 호흡곤란, 객혈과 같은 증상에서는 차이가 없었으나 기침을 호소하는 환자가 많은 경향을 보이나 폐결핵 환자만을 대상으로 분석한 결과로는 양 군에서 차이가 없었다. 양 군에서 체중 감소를 호소한 환자의 빈도는 차이가 없었으나 환자의 체질량 지수는 Beijing 균주에서 $19.1(\pm 2.37)$ non-Beijing 균주에서 $20.8(\pm 3.59)$ 로 적었다.

임상 진단에서 폐외결핵 단독으로 보이는 경우는 적고 폐결핵을 동반한 폐외결핵의 양상으로 나타났다. 약제 내성에서는 Beijing 균주가 내성률이 높았으며 특히 isoniazid 내성률이 높았다. 치료 과정 중 발열이나 기존 질환의 악화를 보이는 역설반응은 양 군에서 차이가 없었으며 치료 결과에서도 차이가 없었다 (Table 3).

Table 3. Comparisons of the clinical findings between Beijing and non-Beijing group

| Parameter | Beijing group No./Total(%) (n = 154) | Non-Beijing group No./Total(%) (n = 68) | <i>P</i> |
|--------------------------------|--|--|----------|
| Gender | | | |
| Male | 91/154(59) | 37/68(54) | 0.615 |
| Female | 63/154(41) | 31/68(46) | |
| Age, mean(SD),y | 47.6(±19.88) | 49.6(±18.50) | 0.462 |
| Previous Tb treatment | 32/154(21) | 12/68(18) | 0.742 |
| Family history of tuberculosis | 25/110(23) | 9/44(20) | 0.927 |
| Smoker | 63/135(47) | 24/58(41) | 0.604 |
| Smoking(mean, pack year) | 12.0(±16.96) | 13.5(±22.97) | 0.660 |
| BMI, mean(SD) | 19.1(±2.37) | 20.8(±3.59) | 0.001 |
| RFLP clustering | | | |
| Yes | 32/154(21) | 13/68(19) | 0.918 |
| No | 122/154(79) | 55/68(81) | |
| Localization | | | |
| Pulmonary | 111/154(72) | 40/68(59) | 0.049 |
| Extrapulmonary | 11/154(7) | 12/68(18) | |
| Both | 32/154(21) | 16/68(24) | |
| Drug resistance | | | |
| One drug | 29/150(19) | 4/66(6.0) | 0.022 |
| Isoniazid | 26/150(17) | 3/66(4.5) | 0.020 |
| Rifampin | 11/150(7.3) | 1/66(1.5) | 0.162 |
| Isoniazid+ Rifampin | 11/150(7.3) | 1/66(1.5) | 0.162 |
| Streptomycin | 7/150(4.6) | 1/66(1.5) | 0.460 |
| Ethambutol | 14/150(9.3) | 1/66(1.5) | 0.073 |

Table 3. Comparisons of the clinical findings between Beijing and non-Beijing group

| Parameter | Beijing group No./Total(%) (n = 154) | Non-Beijing group No./Total(%) (n = 68) | <i>P</i> |
|---------------------------|--|--|----------|
| Symptoms and signs | | | |
| Fever | 63/151(41.7) | 24/68(35.2) | 0.453 |
| Weight loss | 52/109(48.0) | 21/45(47) | 1.000 |
| Cough | 117/151(77.4) | 43/67(64.1) | 0.059 |
| Sputum | 96/150(64.0) | 38/67(56.7) | 0.385 |
| Dyspnea | 55/151(36.4) | 18/68(26.4) | 0.197 |
| Hemoptysis | 25/150(16.6) | 13/67(19.4) | 0.767 |
| Symptom duration (mo.) | 1.6(±2.01) | 2.5(±4.36) | 0.062 |
| Paradoxical response | 11/120(9.1) | 2/41(4.8) | 0.590 |
| Outcome of treatment | | | |
| Favorable | 85/105(80.9) | 28/36(77.7) | 0.865 |
| Unfavorable | 20/105(19.0) | 8/36(22.2) | |

다. Beijing 군주와 non-Beijing 군주 감염증의 방사선학적 차이

폐결핵을 보이는 환자를 대상으로 방사선 소견을 분석하였으며
침범하는 폐부위, 범위, 폐병변의 양상, 흉수, 림프절 종대에서 양
군에서 차이가 없었다 (Table 4).

Table 4. Comparisons of the chest radiological findings between Beijing and non-Beijing group diagnosed with pulmonary tuberculosis

| Parameter | Beijing group | Non-Beijing group | <i>P</i> |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------|
| | No./Total(%) (n = 133) | No./Total(%) (n = 50) | |
| Site of lung | | | |
| Rt upper | 87(65.4) | 40(80) | 0.084 |
| Rt mid | 70(52.6) | 27(54) | 1.000 |
| Rt lower | 44(33.0) | 20(40) | 0.484 |
| Lt upper | 74(55.6) | 32(64) | 0.394 |
| Lt mid | 65(48.8) | 30(60) | 0.239 |
| Lt lower | 47(35.3) | 17(34) | 1.000 |
| Extent of lung | | | |
| < 2 anterior intercostal space | 35(26.3) | 12(24) | 0.394 |
| One half lung | 51(38.3) | 16(32) | |
| One lung | 29(21.8) | 10(20) | |
| Over one lung | 16(12.0) | 11(22) | |
| Type of lesion | | | |
| Consolidation | 56(42.1) | 24(48) | 0.618 |
| Nodule(≥ 1 cm) | 102(76.7) | 34(68) | 0.274 |
| Nodule(2-9mm) | 101(75.9) | 40(80) | 0.761 |
| Cavity | 57(42.8) | 19(38) | 0.642 |
| Miliary | 4(3.0) | 4(8) | 0.281 |
| Endobronchial spread | 9(6.7) | 18(36) | 0.613 |
| Atelectasis | 17(12.7) | 9(18) | 0.520 |
| Effusion | 28(21.0) | 10(20) | 1.000 |
| Lymphadenopathy | 26(19.5) | 10(20) | 1.000 |

라. Beijing 균주와 non-Beijing 균주 감염증의 치료 결과

Beijing 균주와 non-Beijing 균주의 치료 결과 비교에서 균주 사이의 차이는 없었으며 다중 회귀 분석에서 재발이나 치료 실패, 사망에 이르는 나쁜 예후와 관련된 인자는 한쪽 폐야를 넘는 광범위한 폐침윤 (OR 4.11, $P=0.025$), 흡연기간 (OR 1.03, $P=0.04$), 다제내성 (OR 6.09, $P=0.058$)이었다.

IV. 고찰

결핵은 환경적 요소와 숙주의 유전적 요소가 발병에 중요하나 결핵균과 관련된 요소들도 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 분자 역학적 분석법들이 개발되면서 결핵균의 유전형에 따른 연구가 시작되었으며 결핵균의 측면에서 서로 다른 유전형의 결핵균이 감염력이나 병독성에 차이가 있을 수 있다는 견해가 제시되고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 지역사회를 중심으로 확산되고 있는 결핵균의 유전형을 분석하고 최근 감염 및 우세 균주의 특성을 살펴보고 Beijing 균주의 분포를 확인하며 이들 Beijing 균주에서 억제 내성을 비롯한 임상적 특성을 살펴 아시아에서 우세하게 된 이들 균주의 기전을 이해하는데 기초 자료로 삼고자 하였다.

결핵균의 유전학적 분석은 재활성화에 의한 발병이 많은 경우는 분자유전학적 양상이 매우 다양하게 나타나나 유행에 의한 최근 감염의 경우는 같은 유행 균주에 의한 감염이 주류를 이루어 균주군을 이루게 된다. 본 연구에서는 아주 대학 병원에 2년 6개월 동안 내원한 환자를 대상으로 18%의 균주군을 확인하였다. 지역 사회 인구를 대상으로 2-3년간의 검체로 시행한 뉴욕이나 샌프란시스코의 연구에서는 30-40%가 균주군을 이루고 이들이 최근 감염으로 생각되는 것과는 상대적으로 낮은 비율이다.^{26,27} 이는 본 연구가 인구 집단을 대상으로 한 연구가 아닌 점에 차이가 있을 수 있으나 유행률이 높은 지역에서의 상대적인 특징으로도 생각할 수 있겠다. 태국에서 전국적인 조사로 1년간 진단된 828건의 유전형 분석 결과 추가적인 유전형 분석법이 필요하다고 판단되는 IS6110 띠가 5개 이하인 환자를 제외하고서

추정된 균주군이 26.4%였음을 보고하였으며 기간이 짧아 상대적으로 낮은 비율을 보인 것으로 언급한 바 있다.²⁸ 이들 자료에서 같은 균주군 속에 있더라도 감수성 검사 결과가 상이하거나 지역이 달라 최근 감염으로 판단하기에 어려운 점을 들어 유병률이 높은 지역에서는 주의 깊은 평가가 필요하다고 하였다. 국내에서는 과거 결핵연구원에서 138건의 제한절편 길이 다형성 검사법을 통해 6건, 15명 (10.8%)의 균주군 비율을 확인한 바 있는데 이 때의 낮은 비율도 이 당시의 균주가 1995년 국가 결핵 유병률 당시 모아진 균주로 광범위한 지역적 분포를 가지기 때문으로 생각된다.²⁰ 국내의 최근 자료에서도 기간이 짧다는 한계가 있으나 2004년 5월부터 8월까지 경기도 지역 보건소를 통해 진단된 배양 양성 결핵환자 711건을 분석한 결과 IS6110이 없는 환자를 포함하여 50개의 균주군, 180명 (25.3%)이 균주군을 이루었으며 IS6110이 없는 환자를 포함한 점을 고려하면 이보다는 적다고 판단되며 기간을 늘린다면 태국의 자료와 비슷할 것으로 추정된다.²⁹

제한절편 길이 다형성 분석에서 IS6110 띠가 5개 이하인 경우는 변별력이 떨어져 추가로 다른 방법을 이용하여 유전형 분석이 필요하다는 보고들이 있으며^{30,31} 본 연구에서도 띠가 하나인 네 건이 제한절편 길이 다형성 분석으로는 균주군으로 분류되었으나 spoligotyping 소견이 달라 균주군에서 제외하였다. 균주군을 이루는 위험요인으로는 미국에서 국립 결핵 유전형 조사 네트워크 (National Tuberculosis Genotyping Surveillance Network)를 통해 5년간 조사한 1만 명의 결과로는 남자, 폐결핵, 도말양성, 공동, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, 집 없는 사람, 마약중독자, 알코올중독,

일차약제 내성 등이었다.³² 이러한 균주군은 지역의 발병 특성과 관련이 있으며 HIV 감염, 인종, 내성결핵균, 국적 등과 관련이 있으나 공통점은 젊은 연령에서 위험이 높다는 것이다.^{18,26,27,28} 본 연구에서는 균주군을 이룬 군과 그렇지 않은 군에서 나이의 차이가 없었다. 이는 균주군을 이루는 젊은 연령의 환자도 있었으나 국내에서 우세한 K 균주의 균주군에서 보는 바와 같이 재활성화로 추정되는 고연령 환자도 균주군에 포함된 영향으로 생각된다. 재활성화로 추정되는 고령 환자들과 달리 균주군 포함되는 젊은 연령대의 환자들은 최근 감염의 가능성이 높으며 향후 접촉자 조사를 통한 역학 연구와 함께 결핵관리에서 이들을 중심으로 한 관리 계획이 중요할 것으로 생각하였다.

K1 균주는 제한절편 길이 다형성 검사에서 동일한 위치에 IS6110 띠가 10개인 우리 나라에서 가장 흔한 균주이다.¹⁰ 본 연구에서는 9건으로 4%였으며 IS6110 띠가 70% 이상 유사한 K 균주는 34건으로 15%였다. 이는 최근의 경기 지역 연구의 K1 균주 4.6%, K 균주 18%와 유사한 결과라고 생각된다.²⁹ 단일 균주로는 가장 많이 분포하는 이들 균주의 특성을 조사하는 것이 필요할 것으로 생각되며 최근에 임상에서 분리된 K1 균주와 실험실 표준 균주인 CDC1551, H37Rv 균주와 비교하여 다른 8개의 단백질을 찾아내고 일부에서 혈청학적 진단에 이용할 수 있을 것임을 제시한 보고가 있다.³³

1991년 뉴욕에서 내성균 유행이 있었으며 추후 이 균주가 Beijing 균주에 속한다는 것이 확인되었고 이후 중국을 중심으로 아시아 지역 특히 몽고, 한국, 러시아에서는 70% 이상으로 우세하게 나타나는 것으로 보고되었다.¹⁷

본 연구에서 Beijing 균주는 약 70%로 나타났으며 non-Beijing 균주에 비해 내성을 획득한 균주가 많아 이는 기존의 자료와 다르지 않은 것으로 보인다. 1998년부터 2001년까지 결핵 연구원에 의뢰된 743건에 대한 유전형 분석 결과 약 77%가 Beijing 균주였고 다제내성 결핵균에서 Beijing 균주의 비율이 82%로 감수성 균에서 분리율 72%에 비해 높음을 보고한 바 있다.³⁴ 이러한 현상은 Beijing 균주가 우세하게 된 원인으로 제시되는 유전자 돌연변이가 쉬워 숙주에 대한 적응력이 우수하다는 근거가 되고 있다.²²

Beijing 균주가 널리 확산되는 이유에 대한 가설로는 BCG로 유발된 면역력에 대한 내성, 높은 병독성, 전파력의 증대, 돌연변이를 잘 일으키는 것, 다제 내성으로 인한 치료의 어려움과 감염기간의 연장 등이 제시되었으며 이들에 대한 연구가 진행되고 있다.^{13,17,35} Beijing 균주에 대한 실험실 자료로 사람 단핵구에 감염시켰을 때 세포내 성장이 다른 유전형보다 상대적으로 빠르다는 보고가 있으³⁶ IL-12 유도반응이 낮아 숙주의 방어면역을 감소시킨다는 보고도 있다.³⁷ 동물실험으로는 Beijing 균주, Haarlem 균주, Canetti 균주, Somali 균주 등을 비교하여 이들 중 Beijing 균주에서 광범위한 폐렴과 높은 조기 사망률, 초기의 TNF- α 상승, BCG에 의한 방어력이 약함을 보여주고 유전형에 따라 면역병리 소견이 다름을 제시하였으며 백신 개발에 실험실 균주만이 아니라 다양한 결핵균 유전형을 포함하는 백신 개발이 필요하다고 제안하였다.³⁸ 병독성의 측면에서 결핵성 수막염을 유발한 토끼를 이용한 실험에서 CDC 1551 균주에 비해 Beijing 균주가 척수액과 뇌에서의 균수가 많고, 다른 부위로 퍼지기도 잘하고,

백혈구수도 높고 임상증상도 심하였다고 보고하였다.³⁹ 이러한 고병독성의 기전으로 CDC 1551 균주나 실험실 표준 균주 H37Rv에는 없고 Beijing 균주에서만 생성되는 생활성 (bioactive)이 높은 지질인 polyketide synthase(PKS)-derived phenolic glycolipid(PGL)를 그 원인을 제시하였으며 PGL 결핍 돌연변이 균주에서는 이러한 높은 병독성이 감소하는 것을 증명하였다.

Beijing 균주에 대한 임상 자료로는 121명의 인도네시아의 결핵환자를 대상으로 Beijing 균주 (31건)와 non-Beijing 균주 (61건) 사이에 내성이나 임상소견, 방사선 소견, 중증도에 차이가 없으나 치료 중 발열 반응이 48%로 non-Beijing 균 21%에 비해 높았음을 보고한 바 있다 ($P=0.06$).⁴⁰ Beijing 균주와 non-Beijing 균주의 임상적 차이에 대한 러시아 사마라 지역 880건에 대한 연구에서는 66.6%가 Beijing 균주였으며 증상, 징후, 방사선 소견을 비교한 결과 임상 증상이나 징후에는 차이가 없으나 여러 구역을 침범하는 fibrocavernous 양상 결핵이 Beijing 균주 감염의 위험인자이며, 약제 내성이 높다고 보고하였다.⁴¹ 사례는 적으나 Beijing 균주 (33건)와 non-Beijing 균주 (76건)에 의한 폐결핵 환자의 방사선 소견 분석에서 공동, 침범하는 폐엽의 수, 흉수, 속립성 형태를 분석한 연구에서 이들에 차이가 없다는 보고가 있다.⁴²

본 연구에서는 환자의 기저질환, 과거력, 결핵으로 인한 증상과 기간, 객담 도말 검사 결과와 결핵균의 밀도 및 실험실 검사 자료, 체질량 지수를 비교 하였으며 폐결핵 환자의 방사선 소견도 폐엽을 나누어 병변의 크기를

확인하고, 나타나는 형태, 림프절, 흉수, 속립성 결핵 등을 살펴 보았다. 임상 소견에서는 양 군에 차이가 없었으나 Beijing 군에서 체질량 지수가 적어 균주가 병독성이 커 체중감소가 더 많았던 것은 아닌지 추가 연구 자료가 필요하다. 방사선 소견을 구체적으로 자세히 분석한 자료에서 양군에 차이가 없는 것으로 보여 Borgdorff¹⁹의 연구 결과와 같이 방사선 소견에는 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 생각된다. 폐외결핵 단독 소견으로 나타나는 경우에서 Beijing 균주의 비율이 적었는데 폐결핵을 동반하는 폐외결핵의 빈도는 같아 적어도 전파의 측면에서는 폐결핵을 동반하는 것이 용이하다고 판단되었다. 이는 실험실적 연구에서 다른 부위의 전파를 더 잘하였다는 보고와는 달라 좀 더 임상 자료가 필요하다고 생각된다.³⁹ 치료 결과에 있어서도 균주간의 차이는 보이지 않았다. 이는 결핵의 병인이 환경, 숙주 인자, 균주의 특성 등을 포함한 여러가지 요소들에 의해 결정되며 약물치료에 대한 반응과 치료 결과도 이 중 어느 한가지에 의해 좌우되지 않음을 시사한다. 이상과 같은 임상결과를 토대로 Beijing 균주가 우세하게 된 원인으로 제시되는 전파의 측면, 숙주 내에서의 적응력, 내성 획득 능력, 병독성, BCG 영향의 측면을 고려할 때 Beijing 균주가 쉽게 내성을 획득하는 등 숙주내 적응력이 우수하며 다른 균주에 비해 병독성이 높을 가능성이 있다고 판단되었으며 일부 전파에서의 용이성도 고려할 요소로 생각된다. 그러나 전체적으로는 임상적 특징이 다르지 않은 점이 더 많고 본 임상 자료가 의무기록을 검토한 자료라는 제한점을 고려하면 이는 앞으로 좀 더 많은 임상 자료와 실험실적 자료가 뒷받침되어야 할 것이다.

V. 결론

결핵균 배양으로 확진된 환자를 중심으로 분자유전학적 분석을 시행하고 최근 감염 및 우세 균주의 특성을 살펴보고 Beijing 균주의 분포를 확인하며 이들 Beijing 균주에서 약제 내성을 비롯한 임상적 특성을 살펴 아시아에서 우세하게 된 이들 균주의 기전을 이해하는데 기초 자료로 삼고자 하였다. 이와 같은 연구로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 225건의 분석에서 197개의 제한절편 길이 다형성 양상을 보였다. 동일한 제한절편 길이 다형성을 보이는 균주군 16개 군 41건 (18%)을 확인하였다. 방사선 소견이나 임상 소견에서 양 군 사이에 차이가 없었다.
2. 국내 균주의 제한절편 길이 다형성 분석에서 가장 많은 빈도를 보이는 유전자형인 K 균주는 34건 (15.1%)에서 확인되었다. 균주군을 이루는 41건 중 9건에서 동일 K1 균주에 의한 균주군이 관찰되었다.
3. 약제 감수성 결핵 185건 (84.9%), 하나라도 내성인 결핵균 33건 (15.1%), isoniazid와 rifampin을 포함한 여러 약제에 내성인 다제 내성균 12건 (5.5%)을 확인하였다.

4. Spoligotyping 결과 Beijing 균주는 154건으로 69.4%였다. Beijing 균주와 non-Beijing 균주 사이에 성별, 나이, 이전의 치료력, 가족력에 차이가 없었으며 임상 증상 등에서 차이가 없었다. Beijing 균주에 감염된 환자에서 체질량 지수가 적었고 폐외결핵을 단독으로 보이는 경우가 적고, 폐결핵이나 폐결핵을 동반한 폐외결핵의 양상으로 나타났다. 치료 과정 중 발열이나 기존 질환의 악화를 보이는 역설반응이나 치료 결과에서 양 군 사이에 차이가 없었다. 약제 내성에서는 Beijing 균주가 내성률이 높았으며 특히 isoniazid 내성률이 높았다.

5. 폐결핵을 보이는 환자를 대상으로 방사선 소견을 분석하였으며 침범하는 폐부위와 범위, 폐병변의 양상, 흉수, 림프절 종대 등에서 Beijing 균주와 non-Beijing 균주 사이에 차이가 없었다.

6. Beijing 균주와 non-Beijing 균주의 치료 결과에 차이는 없었으며 다중 회귀 분석에서 재발이나 치료 실패, 사망에 이르는 나쁜 예후와 관련된 인자는 한쪽 폐야를 넘는 광범위한 폐침윤, 흡연기간, 다제내성이었다.

본 연구의 결과로 균주군을 이루는 감염 18%를 확인하였으며, 국내에서 우세한 결핵균인 K 균주를 15%에서 확인하였다. 아시아 지역을 중심으로 확산되고 있는 Beijing 균주가 non-Beijing 균주와 비교하여 임상 증상이나 방사선 소견, 치료 결과에서는 차이가 없었으나 폐외결핵을 단독으로 보이는

경우는 적고 폐결핵이나 폐결핵을 동반한 폐외결핵의 양상으로 나타났다. Beijing 균주 환자에서 체질량 지수가 낮아 병독성이 좀 더 높을 가능성을 시사하였으며, non-Beijing 균주에 비해 내성률이 높았다. 이러한 결과로 Beijing 균주는 좀 더 용이한 내성 획득 능력을 가지고 있고, 병독성이 높을 가능성을 제시하였으나 이의 확인에는 향후 좀 더 많은 임상 자료가 축적되어야 할 것으로 사료되었다.

참고 문헌

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control*. Geneva:World Health Organization; 2003.
2. 이은규. 결핵 발생 현황. 감염병 발생 정보. 2003;14:359-367.
3. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31:406-409.
4. Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, Mokrousov I, Vincent V, Rastogi N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:390-396.
5. Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:1347-1349.
6. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2607-2618.
7. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2578-2586.
8. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003;349:1149-1156.
9. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J*

- Intern Med. 2001;249:1-26.
10. Kim SJ, Bai GH, Lee H, Kim HJ, Lew WJ, Park YK, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among high school students in Korea. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5:824-830.
 11. Saunders NA. Strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect.* 1999;38:80-86.
 12. van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4628-4639.
 13. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3234-3238.
 14. Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, Young DB, Shaw RJ. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1997;35:647-651.
 15. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh SL, Shopsin B, Tempalski B, et al. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA.* 1999;282:2321-2327.
 16. Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Sapozhnikova N, Graschenkova O, Steklova L, et al. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:596-602.
 17. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:843-849.
 18. Borgdorff MW, de Haas P, Kremer K, van Soolingen D. *Mycobacterium*

- tuberculosis* Beijing genotype, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1310-1313.
19. Kulkarni S, Sola C, Filliol I, Rastogi N, Kadival G. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mumbai, India. *Res Microbiol.* 2005;156:588-596.
 20. Park YK, Bai GH, Kim SJ. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. *J Clin Microbiol.* 2000;38:191-197.
 21. Mokrousov I, Otten T, Vyazovaya A, Limeschenko E, Filipenko ML, Sola C, et al. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:342-348.
 22. Rad ME, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:838-845.
 23. 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;35:907-914.
 24. Kox LF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM, Kolk AH. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3225-3233.
 25. Kim SJ, Bai GH, Hong YP. Drug-resistant tuberculosis in Korea, 1994. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997;1:302-308.
 26. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* 1994;330:1703-1709.
 27. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by

DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. N Engl J Med. 1994;330:1710-1716.

28. Rienthong D, Ajawatanawong P, Rienthong S, Smithtikarn S, Akarasewi P, Chairprasert A, et al. Restriction fragment length polymorphism study of nationwide samples of *Mycobacterium tuberculosis* in Thailand, 1997-1998. Int J Tuberc Lung Dis. 2005;9:576-581.
29. 조정옥. 결핵균 DNA 지문 클러스터와 결핵환자 거주 특성과의 관련성: 아주대학교 공공정책대학원;2005.
30. Cronin WA, Golub JE, Magder LS, Baruch NG, Lathan MJ, Mukasa LN, et al. Epidemiologic usefulness of spoligotyping for secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. J Clin Microbiol. 2001;39:3709-3711.
31. Radhakrishnan I, K MY, Kumar RA, Mundayoor S. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India. J Clin Microbiol. 2001;39:1683.
32. Ellis BA, Crawford JT, Braden CR, McNabb SJ, Moore M, Kammerer S. Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population. Emerg Infect Dis. 2002;8:1197-1209.
33. Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, Cho SN, et al. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. Proteomics. 2004;4:3299-3307.
34. Park YK, Shin S, Ryu S, Cho SN, Koh WJ, Kwon OJ, et al. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. J Microbiol Methods. 2005;63:165-172
35. Lan NT, Lien HT, Tung le B, Borgdorff MW, Kremer K, van Soolingen D. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. Emerg Infect Dis. 2003;9:1633-1635.
36. Li Q, Whalen CC, Albert JM, Larkin R, Zukowski L, Cave MD, et al.

Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. *Infect Immun.* 2002;70:6489–6493.

37. Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Barry CE, 3rd, et al. Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect Immun.* 2004;72:5511–5514.
38. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol.* 2003;133:30–37.
39. Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, et al. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis.* 2005;192:98–106.
40. van Crevel R, Nelwan RH, de Lenne W, Veeraragu Y, van der Zanden AG, Amin Z, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:880–883.
41. Drobniowski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetzov S, Zakharova S, et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA.* 2005;293:2726–2731.
42. Borgdorff MW, Van Deutekom H, De Haas PE, Kremer K, Van Soolingen D. *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing genotype strains not associated with radiological presentation of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 2004;84:337–340.

Abstract

Molecular types of *Mycobacterium tuberculosis* and their relevance
to the clinical and laboratory characteristics

Young Hwa Choi

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor June Myung Kim)

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates has revolutionized our knowledge about the geographic characteristics and historical stream of transmission of tubercle bacilli. The standard approach to genotyping *M. tuberculosis* isolates is to perform a restriction fragment length polymorphism analysis of the IS6110 gene in different strains. This method was used to prove recent transmission that caused clusters of patients or an outbreak with related strains. The most prevalent strains are the K family, and the K1 strain is especially prevalent in Korea. Another method is a spacer oligonucleotide typing

(spoligotyping) which uses the spacer sequence between any two specific direct repeats that are conserved among strains. Large data bases have been accumulated and they show the geographic distributions of the Beijing strain in East Asian countries. It is not well known why the Beijing strains are prevalent in some countries and why they not prevalent in others. The virulence and the transmissibility of the Beijing strains and the BCG vaccination in affected countries have been suggested as causes, but there is little data to show the clinical characteristics between Beijing and non-Beijing strains. The purpose of the present study was to investigate the molecular epidemiology of tuberculosis in the community with using molecular genotyping and to find out the clinical characteristics of the Beijing strains that would be a cause of successful spreading. The following results were obtained.

1. A total of 225 *M. tuberculosis* isolates were analyzed by RFLP. There were 197 RFLP patterns, and 41 strains (18%) were present in 16 different clusters. There were no differences in the radiological and clinical findings between the cluster groups and the non-cluster groups.

2. The K family, the most prevalent strain in Korea, was found in 15.1% (34 isolates) by performing RFLP. Nine isolates among the 41 clusters were the K1 strain.

3. Among 218 isolates, 185 (84.9%) were susceptible to all 12 test drugs, 33 (15.1%) were resistant to at least one drug, and 12 (5.5%) were multidrug resistant, including to isoniazid and rifampin.

4. One hundred fifty four (69.4%) of 222 *M. tuberculosis* isolates were determined to be the Beijing strains by spoligotyping. There were no differences in gender, age, previous therapy, the family history and the clinical symptoms, fever during treatment, and the paradoxical response between the Beijing and non-Beijing strains. But the body mass index of the Beijing group was lower than that of the non-Beijing group. The drug resistance rate of the Beijing strain, especially to isoniazid, was higher than that of the non-Beijing strain. The active diseases of Beijing group presented as pulmonary tuberculosis with or without extrapulmonary tuberculosis. The presentation of extrapulmonary tuberculosis alone was less frequent in the Beijing group than in the non-Beijing group.

5. There was no statistically significant difference in the chest radiological findings such as the involvement site of lungs, the extent, local manifestation (consolidation, nodule, cavity), effusion and lymphadenopathy between the patients with pulmonary tuberculosis who infected with the Beijing strains and those patients who were infected with the non-Beijing strains.

6. No significant difference was found in treatment outcome between the two groups. The risk factors for a poor treatment outcome were the extent of disease to more than one lung (OR: 4.11, $P=0.025$), multidrug resistance (OR :6.09, $P=0.058$), and smoking duration (OR: 1.03, $P=0.04$).

In conclusion, there were various RFLP patterns, but clusters comprised 18%, which suggests recent transmission. The K family stains were the most prevalent strains and they frequently made clusters. Beijing strains were responsible for 69.4% of all the strains. No significant difference was found in the clinical and radiological findings between the Beijing and non-Beijing strains except for body mass index, the incidence of extrapulmonary tuberculosis and the resistance rate. Beijing strains have higher resistance rate, a lower body mass index and lower incidence of extrapulmonary tuberculosis than

non-Beijing strains. A poor treatment outcome is associated with a large extent of lesion, drug resistance and the smoking duration, but it is not associated with the strains. Our observations suggest that Beijing strains have the ability to easily acquire resistance and they may be more virulent than the non-Beijing group, but the clinical outcomes may not depend on its type. We need more clinical data to define the clinical significance according to the genotype.

Key Words : restriction fragment length polymorphism, molecular epidemiology, *Mycobacterium tuberculosis*, resistance, genotyping