중합효소연쇄반응과 객담검체를 이용한 mycobacteria의 검출 민감성 비교

연세대학교 보건환경대학원
의생명과학전공
이 정 민

중합효소연쇄반응과 객담검체를 이용한 mycobacteria의 검출 민감성 비교

지도 이 혜 영 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 06월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

이 정 민

이정민의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____

심사위원_____

심사위원_____

연세대학교 보건환경대학원

2007년 06월

감사의 글

2년여 동안의 석사 학위과정을 무사히 마치고 논문을 낼 수 있게 해주신 하나님께 감사 드립니다.

논문의 연구계획에서부터 완성이 될 때까지 부족한 저를 끊임없는 인내와 큰 배려로 사랑을 베풀어 주신 이혜영 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 논문심사를 통하여 아낌없는 지도를 해주신 김종배 교수님, 김태우 교수님께 감사를 드립니다. 늘 열의로 정성을 다해 가르침을 주시는 양용석 교수님, 오옥두 교수님, 박용석 교수님께 감사를 드립니다. 논문 계획에서부터 마무리까지 끊기있게 조언을 해준 현주언니, 바쁜 회사생활에도 내 일처럼 도와준 준환선배, 결혼준비로 바쁜 가운데 논문 작업을 도와준 재우, 시험을 앞두고도 조언과 도움으로 함께 해준 종민, 마지막 논문 작업을 도와준 종훈, 힘들때 마다 함께 해준 숙영이. 모두에게 깊은 감사를 드립니다.

마지막으로 이 자리에 있게 해주신 부모님과 오빠에게 감사를 드리며 늘 기도로써 힘이 되어준 저의 사랑하는 성진씨에게 깊은 감사를 드립니다.

2007년 6월

이정민

차 례

그 림 차 례 ····· iii
표 차 례 ····· iv
약 기 호 표 ····· v
국 문 요 약 ····· vi
제 1 장 서 론 ····· 1
제 2 장 연구재료 및 방법 ····· 4
1. 검 체 ····· 4
2. 항산성세균 배양 ····· 4
3. DNA 추출 ····· 4
3.1. 객담 검체에서 DNA 추출 ····· 4
3.2. 배양후 집락 검체에서 DNA 추출 ····· 5
4. Polymerase chain reaction ····· 5
4.1. 결핵균과 비정형 결핵균을 구분하기 위한 two-tube nested PCR 5
4.2. 비정형 결핵균 동정을 위한 PCR-RFLP ····· 6
5. Niacin test ····· 7
제 3 장 결 과 ····· 9
1. 항산성 염색 양성 객담검체의 PCR ····· 9
2. 항산성 염색 양성검체의 배양 ····· 15
3. 항산성 염색 양성검체의 세균 분리배양과정을 통한 PCR ····· 17
4. 항산성 염색 양성검체의 세균 분리배양후 niacin test ····· 23
5. PCR-RFLP를 이용한 비정형 결핵균의 동정 ····· 25
5.1. 객담 검체에서 추출한 DNA를 이용한 비정형 결핵균의 동정 ····· 25

5.2. 세균 분리배양 집락에서 추출한 DNA를 이용한 비정형 결핵균의 동정 ····· 26
제 4 장 고 찰 ····· 27
제 5 장 결 론 ····· 31
참 고 문 헌 ····· 32
Abstract ····· 35

그 림 차 례

Figure 1. Detection of *Mycobacterium tuberculousis* from acid fast bacillus smear-positive sputum specimens by two-tube nested PCR ····· 10

Figure 2. PCR amplification of the *rpoB* gene from acid fast bacillus smear-positive sputum specimens ····· 11

Figure 3. PCR RFLP analysis of acid fast bacillus smear-positive sputum specimens ····· 12

Figure 4. Detection of *Mycobacterium tuberculousis* from cultured colony of acid-fast bacillus smear-positive specimens by two-tube nested PCR ····· 18

Figure 5. PCR amplification of the *rpoB* gene from cultured colony of acid-fast bacillus smear-positive specimens ····· 19

Figure 6. PCR RFLP analysis using cultured colony of acid-fast bacillus smear-positive specimens ····· 20

Figure 7. The graph presents detection rate of mycobacteria from sputum and cultured colony of acid fast bacillus smear-positive specimens by two-tube nested PCR and PCR-RFLP ····· 30

표 차 례

Table 1. Primer sequences for *Mycobacterium tuberculosis*(MTB) and nontuberculous mycobacteria(NTM) ····· 8

Table 2. Isolation of NTM using acid-fast bacillus smear-positive sputum specimens by PCR-RFLP with *Msp* I ····· 13

Table 3. Detection rate of *M. tuberculosis* and NTM from the acid-fast bacillus smear-positive sputum specimens using two-tube nested PCR and PCR-RFLP ····· 14

Table 4. Colony growth for medium from the acid fast bacillus positive specimen ····· 16

Table 5. Isolation of NTM species from acid-fast bacillus smear-positive colony specimens using PCR-RFLP with *Msp* I ····· 21

Table 6. Detection rate of *M. tuberculosis* and NTM from colony of the acid-fast bacillus smear-positive specimens using two-tube nested PCR and PCR-RFLP ····· 22

Table 7. Niacin test of acid-fast bacillus smear-positive colony specimens 24

약 기 호 표

DNA : deoxyribonucleic acid

bp : base pairs

ATCC : American Type Culture Collection

AIDS : aquired immune deficiency syndrome

EtBr : ethidium bromide

PCR : polymerase chain reaction

PCR-RFLP : polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

UV : ultra violet

Taq : *Thermopilus aquaticus*

HIV : human immunodeficiency virus

EDTA : ethylenediamine tetra-acetic acid

TBE : tris borate EDTA

국문요약

중합효소연쇄반응과 객담검체를 이용한 mycobacteria의 검출 민감성 비교

결핵(*Mycobacterium tuberculosis,* MTB) 감염은 아직까지 전 세계에서 높은 유병률과 사망의 주요 원인이 되고 있으며 비정형 결핵(nontuberculous mycobacteria, NTM)은 최근 후천성 면역결핍증(AIDS)이나, 종양, 이식 등으로 면역력이 저하된 환자들의 임상 검체에서 분리빈도가 증가함에 따라 분리 균주의 임상적 의의가 중요시 되고 있다. 이에 항산균 염색을 이용한 객담 도말검사는 결핵균과 비정형 결핵균을 구별할 수 없다는 제한점이 있고, 균 분리배양검사는 시간이 오래 걸린다는 단점이 있어, 본 연구에서는 이러한 제한점을 가진 기존의 검사법을 대신하여 분자생물학적 방법인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 세균 분리배양 검사와 비교하여 보았다. Mycobacteria를 동정하는데 항산균 염색과 3% Ogawa 배지를 이용하였고, 세균 분리배양 후 *M. tuberculosis*를 확인하기 위해서 niacin test를 실시한 결과 집락의 DNA를 추출하여 PCR후 동정된 *M. tuberculosis*와 niacin 양성이 일치함을 확인할 수 있었다. 또, 이 실험에서 항산성균 염색이 2+ 이상인 객담검체와 집락검체 각각에서 DNA를 추출하여 결핵균을 동정하는 방법으로 *M. tuberculosis* complex에 특징적으로 존재하는 insertion sequence(IS) 6110의 특정부위인 547 bp와 285 bp 부분을 증폭한 two-tube nested polymerase chain reaction을 시행하였고, 비정형 결핵균 동정법으로는 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp 부분을 증폭한 후, 제한효소 *Msp* I 을 첨가 PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP)을 시행하였으며, 결핵균과 비정형 결핵균 모두 동정률에 거의 차이가 없었다. 1+ 인 경우는 객담검체에서 PCR한 결과가 31.2%에서 집락검

체의 PCR한 결과 93.7%까지 결핵균과 비정형결핵균의 동정률이 높아졌고, trace인 경우 객담검체에서 PCR 결과가 2%에서 집락검체에서 PCR한 결과가 97.9%까지 결핵균과 비정형 결핵균의 동정률을 높일 수 있었다. 이 실험에서 항산성균 염색 1+ 이하 일때 객담검체와 집락검체로 PCR을 실시하면 결핵균과 비정형 결핵균의 동정률에 차이가 있고, 배양만으로는 결핵균의 동정은 가능하지만 비정형 결핵균의 동정이 가능하지 않으므로 배양검사와 PCR 검사 모두를 병행하므로써 보다 신속하고 정확한 검사결과를 내는데 도움될 것이다.

핵심이 되는 말 : 결핵, 비정형 결핵, 항산균 염색, 배양, PCR, PCR-RFLP, 제한효소 *Msp* I

제 1 장 서 론

항산성세균(*Mycobacterium*)은 acid fast bacilli(AFB)라고도 하며 보통 염색으로는 쉽게 염색되지 않으며 가온하여 일단 염색이 되면 산이나, 알코올, 알카리에 강하고 탈색이 되지 않는 성질을 가지고 있으므로 항산성(acid fastness) 또는 항산성세균(AFB)이라고 한다.

항산성세균중에는 *Mycobacterium* 균속인 *Mycobacterium tubersulosis*(결핵균), *Mycobacterium lepre*(나균), atypical mycobacteria(비정형 결핵균)와 약한 항산성균으로 *Nocardia*, *Gordona*, *Tsukamurella* 및 *Rhodococcus*가 있다. 포유동물에 결핵을 일으키는 균들을 결핵균군(*Mycobacterium tuberculosis* complex)이라 부르며, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti* 등이 속한다. 사람에 감염되는 결핵균은 Lehmann와 Neumann이 1896년에 *Mycobacterium tuberculosis*라고 명명했다. 또한 비정형 결핵균으로 예전에는 mycobacteria other than tuberculosis (MOTT), environmental mycobacteria, opportunistic mycobacteria 등으로 불리어오다 최근에는 NTM(nontuberculous mycobacteria)으로 지칭되고 있다(Falkinham 1996).

결핵 감염은 아직까지 전 세계에서 높은 유병률과 사망의 주요 원인이 되고 있으며, 이중 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis,* MTB)은 비말에 의해 전파되며 흡입된 소수의 세균이 폐포표면에 부착되면 폐포대식구에 의해 탐식되어 증식하기 시작한다. 감염후 숙주내의 정상 면역력을 가진 개체이면 활성화된 T 림프구와 대식구가 주축이 되는 세포개재 면역이 발현된다. 그 결과 tuberculin 양성이 되고 결핵균이 증식하고 있는 폐조직이 반고형의 괴사, 즉 건락괴사가 일어나 그 속의 균들이 대식구로부터 유리된다. 반고형의 건락병변이 연화되어 액화하면 기관지로 결핵균이 배출되면서 결핵의 증상이 나타난다. 폐결핵의 주증상은 기침해소, 객담, 전신쇄약, 발열로 고생을 하며 그 외에도 경림프선결핵(연주창), 장결핵, 신장결핵 등의 질병을 일으킨다(이건섭 외 1999).

또한 비결핵 mycobacteria(nontuberculous mycobacteria, NTM)는 최근 임상 검체

에서 분리빈도가 증가함에 따라 분리 균주의 임상적 의의도 중요시 되고 있다(Falkinham 1996; Kennedy et al. 2003; Sakatani 1999). 후천성 면역결핍증(aquired immune deficiency syndrome, AIDS)이나, 종양, 이식 등으로 면역력이 저하된 환자들에서 발병빈도가 계속증가하고 있다(Horsburgh et al. 1991). 신속발육균의 종류로는 *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonaei* 등이 속하며, 이들 신속 발육군(rapid grower) mycobacteria는 토양이나 자연수에 존재하는 환경유래의 오염균으로 중증의 감염을 일으키는 경우가 종종 있다(심영수 1999). 특히 *M. abscessus*는 주로 연부조직 감염이나 폐 감염을 일으키며 병원성이 강한 것으로 보고 되어 있다(Metchock et al. 1999; Ingram et al. 1993). *M. abscessus*에 의한 감염의 경우 대부분의 항결핵제에 내성을 나타내고 종 내에서도 항균제 감수성이 달라 일반적으로 항균제 감수성 검사가 요구된다. 우리나라에서는 1999년 이후 드물게 국소 조직과 장기에 국한된 연부조직과 폐 감염의 보고가 있었다(임재준 외 1999; 이효원 외 2002; 김연숙 외 2000).

결핵균과 비결핵균의 분리빈도가 증가함에 따라 정확한 동정이 요구되고 있는데, 대표적인 검사법으로 도말검사(AFB stain), 배양법, 분자생물학적 방법을 들 수 있다.

Mycobacteria를 감별동정하는 도말검사는 기법이 간편하고 저렴하여 쉽게 할 수 있고 결과가 빨라 환자관리에 편리할 뿐 아니라 이 방법으로 진단되는 환자가 바로 결핵을 전파하는 전염원이라 역학적 측면에서도 중요하다. 그러나 직접도말검사는 객담 1 ml 내에 10^4개 이상의 균이 있어야 검출이 가능할 정도로 감수성이 낮고, 결핵유병률이 높은 지역에서는 문제가 안되지만 결핵이 많지 않은 지역에서는 도말표본에서 보이는 항산성세균이 결핵균이 아닌 경우가 많아서 특이성도 문제가 되고 있다.

반면에 세균 분리배양검사는 균동정이 가능해 특이성도 높고 비교적 소수의 세균도 검출이 가능해 감수성도 높은 편이지만, 검사과정이 복잡해 비용도 많이 들고 잘 훈련된 요원에 의해서만 행할 수 있으며 검사결과가 3~4 주 이상 걸리는 단점이 있다(김상재 외 1992).

따라서 요즘은 뛰어난 감수성과 특이성에 이어 결과의 신속함을 가진 분자생물학적 방법인 중합효소연쇄반응(polymeras chain reaction, PCR)도 사용하고 있

으나 PCR은 비용과 검체내 세균수 크기를 알려주지 못하는 단점이 있다.

이에 본 연구에서는 mycobacteria의 동정에 있어, 보다 정확하고 신속하게 동정하기 위해서 항산성세균 양성검체를 이용하여 세균 분리 배양검사와 PCR 방법을 비교해 보았다.

제 2 장 연구재료 및 방법

1. 검체

2006년 8월부터 2007년 3월까지 서울시 소재의 한 대학병원에서 결핵환자로 의심되는 객담 검체를 Ziehl-Neelsen's 법에 따라 항산성 염색한 결과 trace 이상의 양성으로 결과가 판독된 266개의 검체를 사용하였다.

2. 항산성세균 배양

객담내에는 결핵균보다 발육속도가 빠른 잡균이 많이 있으므로 이들을 제거하기 위해서 4% NaOH 처리를 이용한다. 강한 alkali는 객담내 오염균을 사멸할 뿐 아니라 객담을 액화시키므로써 항산균이 배지에 접촉할 수 있게 해준다.

신속발육 항산성세균은 5~7 일 이내에 발육하지만, 신속발육 이외의 항산성세균은 4 주이상 발육이 관찰되므로 4 주에 중간결과를 보고하고 8 주까지 배양한다.

3. DNA 추출

3.1. 객담 검체에서 DNA 추출

객담 검체를 4% NaOH로 동량 첨가하여 잘 섞은 다음 15 분후 3,000 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 상층은 버린다. 침전물에 증류수 1 ㎖을 가하고 잘 섞은 후 microcentrifuge tube에 1 ㎖를 넣고 12,000 rpm에서 3 분간 원심분리후 상

층은 버리고 침전물을 추출한다. 각 침전물에 Insta Gene Matrix(Bio-RAD, Hercules, California, USA) 200 ㎕를 첨가 후 잘 섞는다. 이후 56℃ heat block에 30 분 방치한 후 8 분간 끓인 다음 즉시 ice-water에 식힌 후 12,000 rpm에서 3 분 원심분리하여 상층액을 DNA template로 사용하였다. 즉시 사용하지 않을시에는 -20℃에 보관한다.

3.2. 배양 후 집락 검체에서 DNA 추출

3% Ogawa 배지에서 자란 균집락 검체는 200 ㎕의 Insta Gene Matrix액에 풀어 56℃ heat block에 30 분 방치한다. 이후 8 분간 끓인 다음 즉시 ice-water에 식힌 후 12,000 rpm에서 3 분 원심분리하여 상층액을 DNA template로 사용하였다.

4. Polymerase chain reaction

4.1. 결핵균과 비정형 결핵균을 구분하기 위한 two-tube nested PCR

4.1.1. First PCR

선택된 primers가 든 반응 혼합액(mixture, 45 ㎕)에 Insta Gene Matrix에 의해 추출된 DNA 산물 5 ㎕를 가하고 Thermal cycler(GeneAmp PCR system 9700, Perkin-Elmer Cetus, Boston, Massachusetts, USA)를 이용해 표적 DNA를 증폭 합성하였다.

반응 혼합액 조성은 *M. tuberculosis* complex(*M. tuberculosis*, *M. bovis*)

에 특징적으로 존재하는 IS 6110의 547 bp를 증폭하기 위하여 primer로 pr-5인 5′-CTC AAG GAG CAC ATC AGC-3′ 와 pr-6인 5′-TCA TAG GAG CTT CCG ACC-3′를 각각 1 ㎕씩 첨가하고, *Taq* DNA polymerase(Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, California, USA)를 0.25 ㎕, dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 각각 1.0 ㎕씩, 10x reaction buffer 5.0 ㎕, 증류수 33.75 ㎕를 첨가하였다 (Table 1).

반응주기는 pre-denaturation 94℃ 5 분, denaturation 94℃ 1 분, annealing 60℃ 1 분, elongation 72℃ 1 분을 30 cycle을 시행하였다.

4.1.2. Second PCR

선택된 primers가 든 반응 혼합액(mixture, 48 ㎕)에 First PCR product 2 ㎕를 가하고 Thermal cycler를 이용해 표적 DNA를 증폭 합성하였다.

반응 혼합액은 조성은 *M. tuberculosis* complex(*M. tuberculosis*, *M. bovis*)에 특징적으로 존재하는 IS 6110의 285 bp를 증폭하기 위하여 primer로 pr-7인 5′-CTA CGG TGT TTA CGG TGC CC-3′와 pr-8인 5′-TAG GCG TCG GTG ACA AAG GC-3′를 각각 1 ㎕씩 첨가하고, *Taq* DNA plymerase를 0.25 ㎕, dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 각각 1.0 ㎕ 씩, 10x reaction buffer 5.0 ㎕, 증류수 36.75 ㎕를 첨가하였다(Table 1).

반응주기는 pre-denaturation 94℃ 5 분, denaturation 94℃ 1 분, annealing 62℃ 1 분, elongation 72℃ 1 분을 30 cycle을 시행하였다.

반응이 끝난 다음, 반응물 10 ㎕를 취해 2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide(EtBr, 0.5 ㎍/㎖)로 염색하여 302 ㎚의 UV transilluminator (Spectroline Co., Albany, New York, USA)로 DNA bands를 관찰하였다.

4.2. 비정형 결핵균 동정을 위한 PCR-RFLP

NTM 동정을 위하여 추출된 DNA산물에 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp를 증폭하기 위하여 primer로 RPO1 인 5′-TCA AGG AGA AGC GCT ACG A-3′와 RPO2 인 5′-GGA TGT TGA TCA GGG TCT GC-3′를 PCR하였다(Table 1).

증폭된 PCR산물 15 ㎕에 *Msp* I (Boehringer Manheim Biochemicals, Germany) 0.5 ㎕(10 U/㎕), 10x *Msp* I buffer 2 ㎕, 멸균된 증류수 2.5 ㎕를 넣어 20 ㎕의 혼합물을 잘 섞어주고, 13,000 rpm (약 10,000 g)에서 3~5 초간 원심분리 하였다.

37℃ 항온수조에서 90 분간 반응한 후 PRA(PCR-RFLP assay) size marker와 각 효소반응액(10 ㎕)을 4% metaphor TBE agarose gel(FMC Bioproducts, Maine, USA)에 점적한 후 100 V에서 60~75 분간 전기영동 탱크에 얼음을 담아 전기영동하였다.

Gel을 EtBr로 염색한 후 UV transilluminator로 분절편을 확인하였다. 결과판독은 mycobacteria 동정 algorithm을 참고하여 균을 동정하였다(Lee et al. 2000).

5. Niacin test

1-2 ㎖의 멸균 증류수나 식염수를 항산균 표면에 첨가하여 배지속에 접촉하게 하였다. 5-30 분 동안 실온에서(또는 37℃) niacin이 추출되도록 한 다음 추출물의 상층액 0.5 ㎖를 마개가 있는 깨끗한 시험관에 옮겨 넣고, 0.5 ㎖의 10% cyanogen bromide 수용액을 첨가후 0.5 ㎖ 4% anilin alcohol을 넣었다. 실시할 때마다 양성(*M. tuberculosis*)과 음성균주(또는 균을 접종하지 않은 배지)를 대조시험으로 같이 실시하였다.

Table 1. Primer sequences for *Mycobacterium tuberculosis*(MTB) and nontuberculous mycobacteria(NTM)

PCR	Primer	Sequence(5'→3')	Target
Two-tube nested PCR	pr-5	CTC AAG GAG CAC ATC AGC	MTB
	pr-6	TCA TAG GAG CTT CCG ACC	
	pr-7	CTA CGG TGT TTA CGG TGC CC	
	pr-8	TAG GCG TCG GTG ACA AAG GC	
PCR-RFLP	RPO1	TCA AGG AGA AGC GCT ACG A	NTM
	RPO2	GGA TGT TGA TCA GGG TCT GC	

제 3 장 결 과

1. 항산성 염색 양성 객담검체의 PCR

객담 검체에서 DNA를 추출한 후, 결핵균과 비정형결핵균을 구분하기 위하여 two-tube nested PCR과 *rpoB* gene의 360 bp부분을 증폭하는 PCR을 시행하였다.

우선, *M. tuberculosis* complex에 특징적으로 존재하는 IS 6110의 특정부위인 547 bp와 285 bp 부분을 증폭한 two-tube nested PCR을 시행하였다. 그 결과 MTB는 285 bp 부분에 band를 나타내고(Fig 1), band가 나타나지 않은 검체는 NTM 검체로 잠정 결론내렸다. 이 후, 잠정 NTM 검체는 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp 부분을 증폭한 후(Fig 2), *Msp* Ⅰ을 첨가 PCR-RFLP를 시행하여 NTM 동정결과를 확인할 수 있었다(Fig 3, Table 2).

항산성 염색 결과가 trace인 48 검체로 PCR을 시행한 결과 MTB가 1, NTM이 0, 음성이 47 검체에서 확인되었고, 항산성 염색 결과가 1+ 인 16 검체에서는 MTB가 5, NTM이 0, 음성인 검체가 11 로 확인되었다. 또한 항산성 염색 결과가 2+ 인 104 검체에서는 MTB가 100, NTM이 3, 음성 1 검체로 확인되었고, 항산성 염색 결과가 3+ 인 98 검체에서는 MTB가 96, NTM이 2, 음성인 검체가 0으로 확인되었다(Table 3).

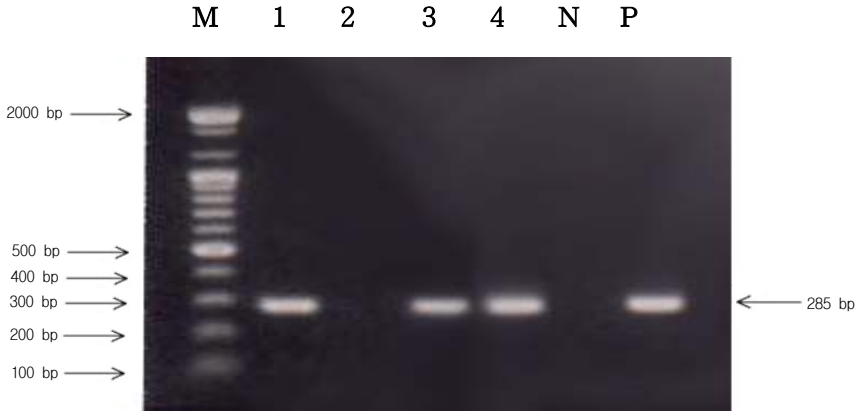

Fig 1. Detection of *Mycobacterium tuberculousis* from acid fast bacillus smear-positive sputum specimens by two-tube nested PCR. PCR products were run on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide(EtBr). Lane M, DNA size marker(Bioneer, Alameda, California, USA); lanes 1, 3, 4, *M. tuberculousis*; lane 2, negative; lane N, negative control, distilled water; lane P, positive control, *M. tuberculosis*(ATCC 25177 standard strain).

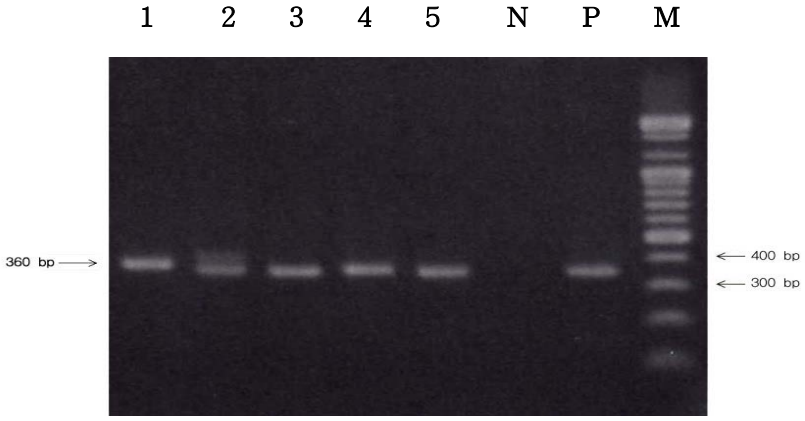

Fig 2. PCR amplification of the *rpoB* gene from acid fast bacillus smear-positive sputum specimens. PCR products were run on a 2% agarose gel. Lane M, DNA size marker; lanes 1~5, positive; lane N, negative control, distilled water; lane P, positive control, *M. tuberculosis*(ATCC 25177 standard strain).

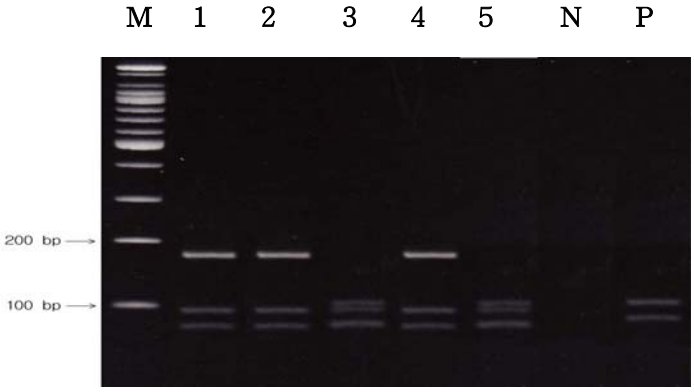

Fig 3. PCR RFLP analysis of acid fast bacillus smear-positive sputum specimens. Amplified DNAs were digested with *Msp* I and run on a 4% metaphore agarose gel. Lane M, PCR-RFLP size marker; lane 1, *M. intracellulare*; lane 2, *M. intracellulare*; lane 3, *M. abscessus*; lane 4, *M. intracellulare*; lane 5, *M. abscessus*; lane N, negative control, distilled water; lane P, positive control, *M. avium*.

Table 2. Isolation of NTM using acid-fast bacillus smear-positive sputum specimens by PCR-RFLP with *Msp* I

Specimens No.	Identified NTM species	PCR product size(bp)	DNA fragment size(bp)
1	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
2	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
3	*M. abscessus*	360	105, 95, 80
4	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
5	*M. abscessus*	360	105, 95, 80
c	Positive control	*M. avium*	105, 80, 50, 45
c	Negative control	distilled water	

Table 3. Detection rate of *M. tuberculosis* and NTM from the acid-fast bacillus smear-positive sputum specimens using two-tube nested PCR and PCR-RFLP

AFB	No. of sample	MTB	NTM	Negative	D/R(%)
-/+	48	1	-	47	2.0
1+	16	5	-	11	31.2
2+	104	100	3	1	99.0
3+	98	96	2	-	100.0
Total	266	202	5	59	77.8

D/R : Detection rate.

2. 항산성 염색 양성검체의 배양

항산성 염색 trace 이상인 검체의 순수분리 동정을 위하여 3% Ogawa 배지에 배양을 시행하였다.

항산성 염색 결과가 trace인 48 검체로 배양한 결과 양성인 검체가 47, 음성인 검체가 1, 항산성 염색 결과가 1+ 인 16 검체에서는 양성이 15, 음성이 1 검체이며, 항산성 염색 결과가 2+ 인 104 검체에서는 양성이 104, 음성이 0, 항산성 염색 결과가 3+ 인 98 검체에서는 양성이 98 검체, 음성이 0 으로 확인되었다(Table 4).

Table 4. Colony growth for medium from the acid fast bacillus positive specimen

AFB	No. of sample	Growth	Non-growth
-/+	48	47	1
1+	16	15	1
2+	104	104	-
3+	98	98	-
Total	266	264	2

* The culture was performed at 3% Ogawa medium.

3. 항산성 염색 양성검체의 세균 분리배양 과정을 통한 PCR

항산성 염색 trace이상인 검체를 배양하여 분리한 세균 집락의 DNA를 추출하여 결핵균과 비정형결핵균을 구분하기 위하여 two-tube nested PCR과 *rpoB* gene의 360 bp부분을 증폭하는 PCR을 시행하였다.

우선, *M. tuberculosis* complex에 특징적으로 존재하는 IS 6110의 특정부위인 547 bp와 285 bp 부분을 증폭한 two-tube nested PCR을 시행하였다. 그 결과 MTB는 285 bp 부분에 band를 나타내고(Fig 4), band가 나타나지 않은 검체는 NTM 검체로 결론내렸다. 이 후, NTM 검체는 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp 부분을 증폭한 후(Fig 5), *Msp* I 을 첨가 PCR-RFLP를 시행하여 NTM 동정결과를 확인할 수 있었다(Fig 6, Taable 5).

항산성 염색 결과가 trace인 48 검체로 PCR을 시행한 결과 MTB가 40, NTM이 7, 음성이 1 검체에서 확인되었고, 항산성 염색 결과가 1+ 인 16 검체에서는 MTB가 12, NTM이 3, 음성인 검체가 1 으로 확인되었다. 또한 항산성 염색 결과가 2+ 인 104 검체에서는 MTB가 100, NTM이 4, 음성 0 검체로 확인되었고, 항산성 염색 결과가 3+ 인 98 검체에서는 MTB가 96, NTM이 2, 음성인 검체가 0 으로 확인되었다(Table 6).

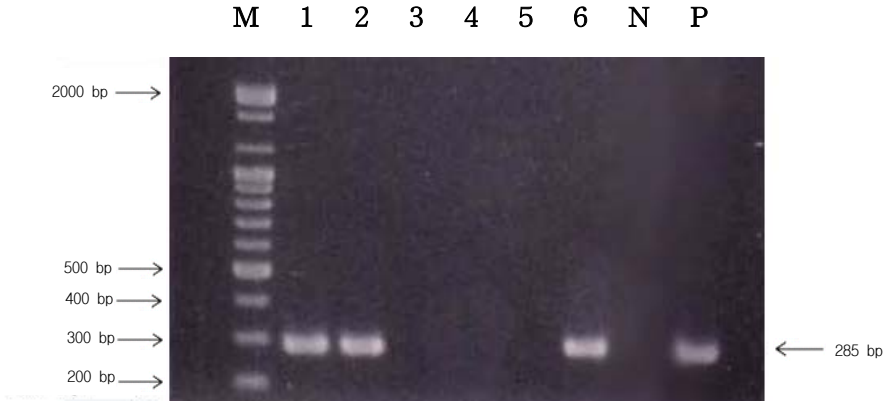

Fig 4. Detection of *Mycobacterium tuberculousis* from cultured colony of acid-fast bacillus smear-positive specimens by two-tube nested PCR. PCR products were run on a 2% agarose gel. Lane M, DNA size marker; lanes 1, 2, 6, *M. tuberculousis*; lanes 3, 4, 5, negative; lane N, negative control, distilled water; lane P, positive control, *M. tuberculosis*(ATCC 25177 standard strain).

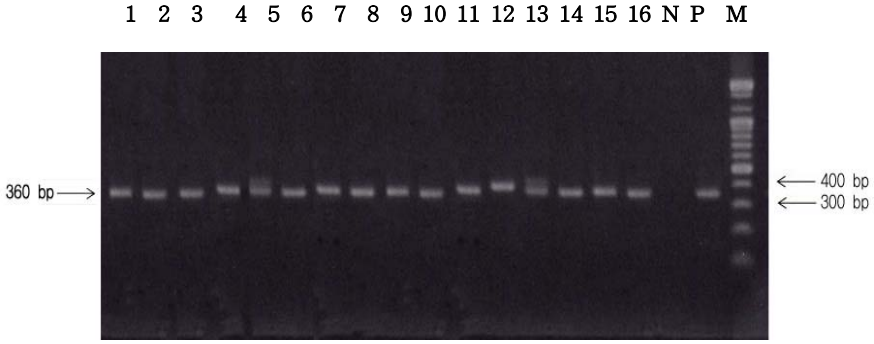

Fig 5. PCR amplification of the *rpoB* gene from cultured colony of acid-fast bacillus smear-positive specimens. PCR products were run on a 2% agarose gel. Lane M, DNA size marker; lanes 1~16, positive; lane N, negative control, distilled water; lane P, positive control, *M. tuberculosis*(ATCC 25177 standard strain).

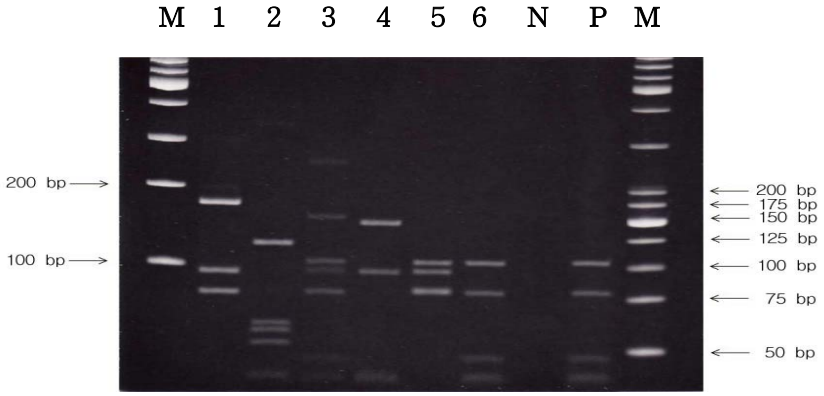

Fig 6. PCR RFLP analysis using cultured colony of acid-fast bacillus smear-positive specimens. Amplified DNAs were digested with *Msp* I and run on a 4% metaphore agarose gel. Lanes M, PCR-RFLP size marker, 25/100 bp mixed DNA ladder; lane 1, *M. intracellulare*; lane 2, *M. intracellulare*; lane 3, *M. abscessus*; lane 4, *M. intracellulare*; lane 5, *M. abscessus*; lane 6, *M. avium*; lane N, negative control, distilled water; lane P, positive control, *M. avium*.

Table 5. Isolation of NTM species from acid-fast bacillus smear-positive colony specimens using PCR-RFLP with *Msp* I

Specimens No.	Identified NTM species	PCR product size(bp)	DNA fragment size(bp)
1	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
2	*M. terrae*	360	130, 62, 57
3	*M. avium, intracellulare*	360	105, 80, 50, 45 175, 95, 80
4	*M. gordonae* type Ⅰ	360	150, 95, 45
5	*M. abscessus*	360	105, 95, 80
6	*M. avium*	360	105, 80, 50, 45
7	*M. avium*	360	105, 80, 50, 45
8	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
9	*M. abscessus*	360	105, 95, 80
10	*M. fortuitum* Ⅱ	360	175, 105, 70
11	*M. fortuitum* Ⅱ	360	175, 105, 70
12	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
13	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
14	*M. abscessus*	360	105, 95, 80
15	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
16	*M. abscessus*	360	105, 95, 80
c	Positive control	*M. avium*	105, 80, 50, 45
c	Negative control	distilled water	

Table 6. Detection rate of *M. tuberculosis* and NTM from colony of the acid-fast bacillus smear-positive specimens using two-tube nested PCR and PCR-RFLP

AFB	No. of sputum specimens	MTB	NTM	Negative	D/R(%)
-/+	48	40	7	1	97.9
1+	16	12	3	1	93.7
2+	104	100	4	-	100.0
3+	98	96	2	-	100.0
Total	266	248	16	2	99.2

D/R : Detection rate.

4. 항산성 염색 양성검체의 세균 분리배양 후 niacin test

항산성 염색 trace 이상인 검체의 순수분리 동정을 위하여 3% Ogawa 배지의 배양을 통해 확인된 세균집락에 niacin test를 실시하여 MTB 검체를 분리하였다.

세균 분리배양 후 MTB를 확인하기 위해서 niacin test를 실시한 결과 항산성 염색 trace인 경우 집락(colony)이 양성인 47 검체중 40 검체, 1+ 인 경우 colony가 양성인 15 검체중 12 검체, 2+ 인 경우 colony가 양성인 104 검체중 100 검체, 3+ 인 경우 colony가 양성인 98 검체중 96 검체가 niacin test 양성임을 확인할 수 있었다(Table 7).

Table 7. Niacin test of acid-fast bacillus smear-positive colony specimens

AFB	Culture positives	Niacin test positives	Niacin test Negatives
-/+	47	40	7
1+	15	12	3
2+	104	100	4
3+	98	96	2
Total	264	248	16

5. PCR -RFLP를 이용한 비정형 결핵균의 동정

5.1. 객담 검체에서 추출한 DNA를 이용한 비정형 결핵균의 동정

항산성 염색 trace이상인 객담 검체의 DNA를 추출하여 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp를 증폭하였다(Fig 2). *Msp* I 을 첨가한 후, PCR-RFLP를 이용한 다양한 크기의 절편은 이전의 연구를 통하여 밝혀진바 있는 algorithm을 이용하여 비정형 결핵균 동정을 확인할 수 있었다(Fig 3, Table 2).

5.2. 세균 분리배양 집락에서 추출한 DNA를 이용한 비정형 결핵균의 동정

항산성 염색 trace이상인 검체를 배양한 후, 집락(colony)의 DNA를 추출하여 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp를 증폭하였다(Fig 5). *Msp* I 을 첨가한 후, PCR-RFLP를 이용한 다양한 크기의 절편은 이전의 연구를 통하여 밝혀진바 있는 algorithm을 이용하여 비정형 결핵균 동정을 확인할 수 있었다(Fig 6, Table 5).

제 4 장 고 찰

항산균 염색을 이용한 객담 도말검사는 결핵균과 비정형 결핵균을 구별할 수 없다는 제한점이 있고(American Thoracic Society 2000), 균 분리배양검사는 시간이 오래 걸린다는 단점이 있어, 본 연구에서는 이러한 제한점을 가진 기존의 검사법을 대신하여 요즈음 사용되고 있는 분자생물학적 방법인 PCR을 이용하여 세균 분리배양 검사와 비교하여 보았다.

실험에서 항산성세균 염색이 2+ 이상인 객담검체와 집락검체 각각에서 DNA를 추출하여 MTB를 동정하는 방법으로 *M. tuberculosis* complex에 특징적으로 존재하는 IS 6110의 특정부위인 547 bp와 285 bp 부분을 증폭한 two-tube nested polymerase chain reaction을 시행하였고, NTM 동정법으로는 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp 부분을 증폭한 후, 제한효소 *Msp* I 을 첨가 PCR-RFLP를 시행한 결과, MTB와 NTM 동정률에 거의 차이가 없었다. 반면 1+ 인 경우는 객담검체에서 PCR한 결과가 31.2%에서 집락검체의 PCR한 결과 93.7%까지 MTB와 NTM의 동정률이 높아졌고, trace인 경우 객담검체의 PCR 결과가 2%에서 집락검체의 PCR한 결과 97.9%까지 MTB와 NTM의 동정률을 높일 수 있었다. 이것으로 항산성세균 염색 2+ 이상일 때는 객담검체와 집락검체의 PCR 결과에서 MTB와 NTM의 동정에 별차이가 없으며, 1+ 이하일 경우는 MTB와 NTM의 동정에 차이가 있음을 알 수 있다(Fig. 7).

세균 분리배양 검사 결과 항산성균 양성 266 검체중 264 검체가 집락을 형성하였으며, 항산성세균 염색 trace와 1+ 검체에서는 각각 1개씩 배양되지 않았다. 이는 객담검체에서 DNA를 추출하여 PCR한 것과 배양을 통해 집락의 DNA를 추출하여 PCR한 것 어느 곳에도 동정되지 않은 것으로 원인이 규명되지 않은 문제점으로 남아있다(Table 4).

세균 분리배양 후 MTB를 확인하기 위해서 niacin test를 실시한 결과 항산성

염색 trace인 경우 40 검체, 1+ 인 경우 12 검체, 2+ 인 경우 100 검체, 3+ 인 경우 96 검체가 niacin test 양성임을 확인할 수 있었으며(Table 7), 이 결과와 집락의 DNA를 추출하여 PCR한 MTB가 일치함을 확인할 수 있었다.

여기서는 다양한 종류의 NTM 검체가 발견되었는데, 우선 객담검체에서 DNA를 추출하여 PCR-RFLP를 이용하여 *M. intracellulare*와 *M. abscessus*가 동정 되었으며, 배양을 통해 집락의 DNA를 추출하여 PCR-RFLP를 이용한 것에는 *M. intracellulare*, *M terrae*, *M. avium*, *M. gordonae* type Ⅰ, *M. abscessus*, *M. fortuitum* Ⅱ 등이 동정되었다. 또한 객담검체에서 DNA를 추출하여 PCR-RFLP를 이용하여 동정된 NTM의 항산성 염색의 강도는 2+ 이상에서 나타남을 확인할 수 있고, 배양을 통해 집락의 DNA를 추출하여 PCR-RFLP로 동정된 NTM은 항산성세균 염색의 강도와는 무관했다.

Mycobacteria에는 약 70 여종이 있으며 이중 일부는 폐결핵, 피부와 연조직 감염, 림프절감염, 파종성(산재성)감염을 일으키고 있어 정확한 동정이 요구되고 있다(Vareldzis et al. 1994; Wolinsky et al. 1992). 이번 실험에서 동정된 NTM 균중 *M. abscessus*는 신속발육균에 속하며 병원성이 강한 것으로 보고되어 있다(Metchock et al. 1999). 국내에서도 면역저하 환자의 증가에 따라 *M. abscessus*에 의한 감염이 증가하고 있으며, *M. abscessus*에 의한 감염의 경우 대부분의 항결핵제에 내성을 나타내고, 종내에서도 항균제 감수성이 달라 일반적으로 항균제 감수성이 요구된다. 최근에는 연부조직 감염에서 진행하여 균혈증을 보인 환자의 검체를 포함하여 피부조직과 객담, 혈액 등으로부터 *M. abscessus*를 분리 동정하여 감염 경로와 경과, 치료, 및 세균의 특성에 대하여 보고된 바도 있다(김정현 외 2004). 이에 세균 분리배양을 하는 데 있어 신속발육균이 MTB 검체에 섞일 수 있으므로 배양기간을 6주이상 충분히 둔 후, MTB와 NTM 동정을 병행하는 것이 최선의 방법일 것이다. 하지만 이 방법을 모두 사용하기에는 비용면에서 경제적이지 않으므로 앞으로 생각해 볼 문제이기도 하다. 또한 항산성 염색 trace 이상의 양성 266 검체를 임의로 추출한 것임으로 MTB와 NTM의 분리빈도에 따른 통계처리를 나타내는데 실험에 사용된 전체 검체수의 부족한 문제점이 있으며, 동정된 16 개의 NTM 검체 역시 발병률이 높은 NTM 검체를 나타내는데 적절하지

못한 문제점이 있다. 그러므로 좀 더 많은 수의 비교실험이 지속적으로 연구되어야 할 것이다.

이 실험에서 항산성균 염색 1+ 이하 일때 객담검체와 집락검체로 PCR을 실시하면 결핵균과 비정형 결핵균의 동정률에 차이가 있고, 배양만으로는 결핵균의 동정은 가능하지만 비정형 결핵균의 동정이 가능하지 않으므로 배양검사와 PCR 검사 모두를 병행하므로써 보다 신속하고 정확한 검사결과를 내는데 도움될 것이다.

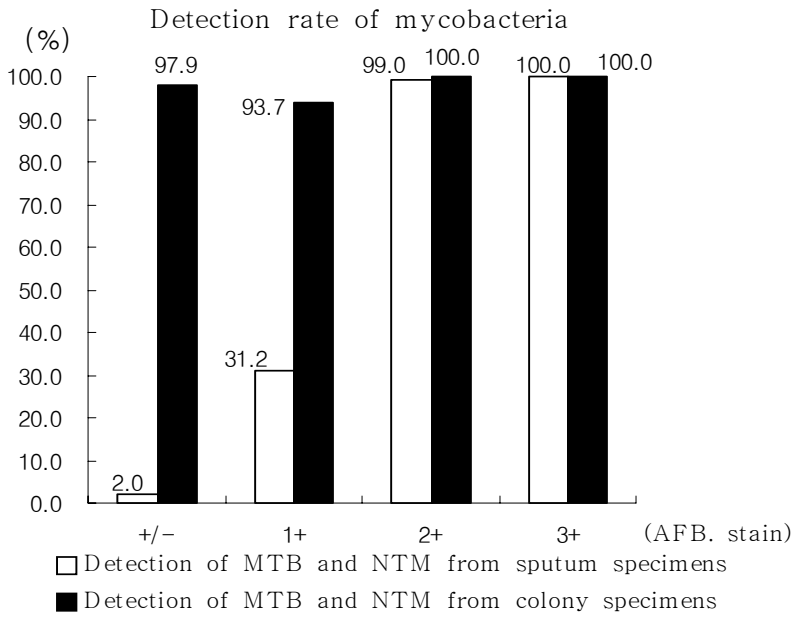

Fig. 7. The graph presents detection rate of mycobacteria from sputum and cultured colony of acid fast bacillus smear-positive specimens by two-tube nested PCR and PCR-RFLP.

제 5 장 결 론

결핵(MTB) 감염은 아직까지 전 세계에서 높은 유병률과 사망의 주요 원인이 되고 있으며 비정형 결핵(NTM)은 최근 후천성 면역결핍증(AIDS)이나, 종양, 이식 등으로 면역력이 저하된 환자들의 임상 검체에서 분리빈도가 증가함에 따라 분리 균주의 임상적 의의가 중요시 되고 있다. 이에 본 실험에서는 객담검체와 배양한 집락검체를 이용하여 PCR과 균 분리배양 검사를 비교하여 보았다. 검사방법으로 배양, niacin test, PCR을 이용하였다. PCR은 결핵균을 동정하는 방법으로 *M. tuberculosis* complex에 특징적으로 존재하는 IS 6110의 특정부위인 547 bp와 285 bp 부분을 증폭한 two-tube nested PCR과 비정형 결핵균을 동정하는 방법으로 mycobacteria에 공통적으로 존재하는 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp 부분을 증폭한 후, 제한효소 *Msp* I 을 첨가 PCR-RFLP을 시행하였다. 항산성세균 염색 2+ 이상일때 객담과 집락검체 모두 MTB와 NTM의 동정에 거의 차이가 없었으며, 1+ 일때 객담검체 31.2%에서 집락검체 93.7%로 MTB와 NTM의 동정률이 높아졌고, trace일 경우 객담검체 2%에서 집락검체 97.9%까지 MTB와 NTM의 동정률이 향상되었다. 그러므로 항산성균 염색 1+ 이하 일때 객담검체와 집락검체로 PCR을 실시하면 결핵균과 비정형 결핵균의 동정률에 차이가 있고, 배양만으로는 결핵균의 동정은 가능하지만 비정형 결핵균의 동정이 가능하지 않으므로 배양검사와 PCR 검사 모두를 병행하므로써 보다 신속하고 정확한 검사결과를 내는데 도움될 것이다.

참 고 문 헌

American Thoracic Society. 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adult and children. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1376-1395.

Falkinham, JO. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 9: 177-215.

Grosset J, Vareldzis BP, Kantor ID, Crofton J, Laszlo A, Felten M. 1994. Drug resistant tuberculosis : Laboratory issues(World Health Organization recommendations). *Tubercle Lung Dis*, 75: 1-7.

Horburgh CR Jr. 1991. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 324: 1332-8.

Ingram CW, Tanner DC, Durack DT, Kernodle W, Corey GR. 1993. Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis*, 16: 463-71.

Kennedy MP, O'Conor TM, Ryan C, Sheehan S, Cryan B, Bredin C. 2003. Nontuberculous mycobacteria: incidence in Southwest Ireland from 1987 to 2000. *Respir Med*, 97: 257-63.

Lee HY, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. 2000. Specific identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the

rpoB gene. *J Clin Microbiol*, 37: 1714-1720.

Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ, Jr. 1999. Chapter 25. *Mycobacterium*. In:Patrick RM, Ellen JB, Michael AP, Fred CT, Robert HY, editor. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: ASM press, 399-437.

Sakatani M. 1999. Nontuberculous mycobacteriosis; the present status of epidemiology and clinical studies. *Kekkaku*, 74: 377-84.

Wolinsky E. 1992. Mycobacterial disease other than tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 15: 1-12.

김상재, 박영길, 조상현, 심명섭. 1992. 핵산중합연쇄반응에 의한 병리검체내 결핵균의 검출. Ⅰ. Primers선택과 반응조건. *대한미생물학회지*, 27(1): 462-471.

김연숙, 홍일철, 김춘관, 김신우, 김성민, 백경란. 2000. *Mycobacterium abscessus* 에 의한 피부 및 연부조직 감염 1예. *감염*, 32: 64-8.

김정현, 최원호, 강정옥, 최태열. 2004. *대한임상미생물학회지*, 7(1): 84-89.

심영수. 1993. 비결핵 마이코박테리움증. In;천효영. 결핵. 4판. 서울: 고려의학, 337-50.

이건섭, 김승곤, 김신무, 정경석, 김영권, 정태화, 오흥백. 1999. 진단 병원미생물학. 서울: 고려의학.

이효원, 김미나, 심태선, 배길한, 배직현. 2002. 면역적격자에서 비결핵마이코박테리

아의 폐감염. *결핵 및 호흡기질환*, 53: 173-82.

임재준, 오명돈, 유철구, 송영욱, 김영환, 서정욱 등. 1999. 전신성 홍반성 낭창 환자에서 발생한 *Mycobacterium abscessus*에 의한 폐렴 1예. *결핵 및 호흡기질환*, 46: 96-102.

Abstract

Identification and sensitivity comparision of mycobacteria using polymerase chain reaction and sputum specimen

Lee, Jung Min
Dept. of Biomedical Life Science
The Graduate School of Health and Environment
Yonsei University

Although *Mycobacterium tuberculosis* complex strains remain responsible for the majority of diseases caused by mycobacterial infections worldwide, the increase in HIV(human immuno deficiency virus) infections resulted in the emergence of other non-tuberculous mycobacteria as clinically significant pathogens. In this study, *M. tuberculosis* was detected by two-tube nested polymerase chain reaction(PCR) and non-tuberculous mycobacteria was detected by PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP) with *Msp* I. The two-tube nested PCR results were confirmed by niacin test after culture for *M. tuberculosis.* For acid-fast stain > 2+ case, detection of mycobacteria was similar for both sputum and cultured colony specimens. However, it was different for acid-fast stain < 1+ case. In conclusion, it is necessary to use both culture and PCR tests for the faster and more accurate mycobacteria identification.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria, acid-fast stain, culture, polymerase chain reaction, PCR-restriction fragment length polymorphism, restriction enzyme *Msp* I