중합효소연쇄반응을 이용한 항산성 염색 양성 검체에서의 결핵균과 비정형 결핵균의 감별동정

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

이 성 덕

중합효소연쇄반응을 이용한 항산성 염색 양성 검체에서의 결핵균과 비정형 결핵균의 감별동정

지도 이 혜 영 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

이 성 덕

이성덕의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 보건환경대학원

2006년 6월 일

감사의 글

생각이 바뀌면 행동이 바뀌고, 행동이 바뀌면 습관이 바뀌고, 습관이 바뀌면 운명이 바뀐다. 하나님께 감사드립니다.

이 논문이 나오기까지 깊은 관심과 배려, 인내로 이끌어주신 이혜영 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 밤늦게까지 성심과 열의로 강의를 이끌어주신 양용석 교수님, 오옥두 교수님, 김종배 교수님, 김태우 교수님, 박용석 교수님께 감사를 드립니다.

되돌아보면 쉽지만은 않았던 길을 모두가 하나처럼 직장과 학업을 같이하면서 서로에게 위로와 격려로 이 순간까지 같이 왔던 이경철 선생님, 안병락 선생님, 조용희 선생님께 다시 한번 감사를 드리고, 항상 곁에 있는 것만으로도 든든했던 임병혁 선생님에게도 감사를 드립니다. 실험의 초반을 같이 했던 최은주 선생님, 실험중반부터 끝까지 항상 같이하며 아낌없는 조언과 기술을 지도해준 김현철 선생님, 그저 한방에 있었던 것만으로도 도움이 되었던 방혜은 선생님, 김연 선생님에게 감사를 드립니다. 그 외 짧은 시간이지만 같이했던 M&D 선생님들과, 입학과 졸업을 같이하는 김준호, 황주환에게도 감사를 표하며, 학업의 분위기를 다져준 다른 대학원생분들에게도 감사를 드립니다. 특별히 학업의 독려와 아낌없는 조언으로 이 순간까지 함께하여주신 서울보건대학 김태전 교수님에게 감사를 드립니다. 검체수집에 많은 도움을 주신 미생물방 선생님들과, 초반실험에서 아낌없는 지원을 해주신 임상의학연구소 선생님들에게 감사를 드립니다.

지금의 나를 있게 하여주신 부모님과 형, 누님들에게 감사를 드리며 어릴적 나를 생각하게 해주는 조카들에게 사랑을 전하고 싶습니다. 나를 이해해주고 평생을 같이하고자 하는 사랑하는 이에게도 나의 작은 마음을 전합니다.

나의 작은 결실이 밑거름이 되어 큰 열매로 다가오는 날을 생각하며 나의 생각이 운명으로 돌아오는 날을 꿈꾸겠습니다.

2006년 6월

이 성 덕

목 차

표 및 그림 차례 ····· ii
국문요약 ····· iii
제1장 서론 ····· 1
제2장 연구재료 및 방법 ····· 3
1. 검체 ····· 3
2. DNA 추출 ····· 3
3. PCR ····· 3
1) 결핵균과 비정형 결핵균을 구분하기 위한 one-tube nested PCR ····· 3
2) 결핵균 확인을 위한 two-tube nested PCR ····· 4
3) 동정을 위한 PCR ····· 5
4. PCR-RFLP ····· 6
제3장 결과 ····· 8
1. 항산성 염색과 one-tube nested PCR의 비교 ····· 8
2. 항산성 염색과 two-tube nested PCR의 비교 ····· 11
3. 항산성 염색과 one-tube nested PCR 및 two-tube nested PCR의 비교 ····· 14
4. PCR-RFLP를 이용한 mycobacteria의 동정 ····· 16
제4장 고찰 ····· 20
제5장 결론 ····· 24
참고문헌 ····· 25
Abstract ····· 30

표 및 그림 차례

Table 1. Detection rate of *M. tuberculosis* and NTM from the acid fast stain positive specimens using one-tube nested PCR ····· 10

Table 2. Detection rate of *M. tuberculosis* using two-tube nested PCR from the acid fast stain positive specimens that were not detected by one-tube nested PCR ····· 13

Table 3. Detection rate of *M. tuberculosis* using combined one-tube and two-tube nested PCR ····· 15

Table 4. Nontuberculous mycobacterial species identified from acid fast stain positive clinical isolates. ····· 19

Figure 1. Algorithm for mycobacterial identification ····· 7

Figure 2. PCR amplification of clinical isolates using one-tube nested PCR for detection of *M. tuberculosis* and NTM ····· 9

Figure 3. PCR amplification of clinical isolates using two-tube nested PCR for detection of *M. tuberculosis* ····· 12

Figure 4. PCR amplification of clinical isolates using two-tube nested PCR for identification of NTM ····· 17

Figure 5. PCR-RFLP analysis for identification of mycobacterial clinical isolates ····· 18

국 문 요 약

중합효소연쇄반응을 이용한 항산성 염색 양성 검체에서의 결핵균과 비정형 결핵균의 감별동정

결핵의 진단에 사용되는 방법으로서의 염색법은 소요시간이 짧고 경제적이기는 하나 결핵균과 비정형 결핵균의 감별이 안가는 단점을 가지고 있다. 반면에 배양법은 결핵균과 비정형 결핵균의 감별 및 동정, 그리고 항생제 감수성 검사까지도 할 수 있다는 장점이 있으나 시간이 오래걸려 진단이 지연되는 단점이 있다. 본 실험에서는 신속하고 정확하며 결핵 및 비결핵균을 검출하고 동정 할 수 있는 PCR 결과와 염색결과를 비교하여 그 검출률의 민감도 및 특이도를 비교하고자 하였다. 실험에 사용되어진 검체는 국내소재 대학병원의 검사실을 통하여 얻어진 255개의 호흡기 검체를 대상으로 하였다. 우선 *rpoB* gene을 이용한 one-tube nested PCR로써 결핵균 및 비정형 결핵균에 모두 존재하는 360 bp와 결핵균에만 존재하는 190 bp의 부위를 증폭했으며 결핵균과 비정형 결핵균의 감별이 PCR로 가능함을 알 수 있었다. 이어 이 실험을 통하여 음성으로 판독되었던 34검체에 대하여 16S-23S rRNA spacer gene을 target으로 한 two-tube nested PCR을 시행한 결과의 one-tube nested PCR에 의한 약 87%의 결핵균 검출률을 93%까지 향상 시킬 수 있었다. One-tube nested PCR 결과 비정형 결핵균으로 판독된 검체를 대상으로 PCR-RFLP법을 이용한 mycobacteria 동정을 시행한 결과 임상적으로 의의가 있는 *M. avium*과 *M. intracellulare*가 동정되었다. 이들 mycobacteria 균을 보유했던 환자의 임상기록을 조사한 결과, 항산성 염색 결과 양성으로 판정되어 결핵약이 투여되었으나 환자의 상태가 호전되지 않아 균동정을 실시하였고 그 결과 비정형 결핵균으로 판독되어 그에 적절한 약으로 교체 된 것이 확인되었

다. 따라서 항산성 염색 결과 양성인 검체를 대상으로 PCR 검사법을 이용한 결핵 및 비정형 결핵균의 감별동정을 시행하는 것이 정확한 진단에 유용함을 확인하였다.

핵심 되는 말 : 결핵균, 비정형 결핵균, 항산성 염색 양성균, PCR, PCR-Restriction Fragment Length, Polymorphism (PCR-RFLP)

제 1 장 서 론

현재 전세계 인구의 약 1/3정도가 결핵균에 감염되어 있으며, 매년 약 3백만명의 인구가 결핵으로 인해 사망하고(Snider and La Montagne, 1994), 또 다른 약 8백만의 새로운 환자가 발생하는 것으로 추정되고 있다(*B*loom and Murray, 1992; Kochi, 1991). 이러한 결핵의 가장 확실한 진단 방법은 결핵균에 의한 감염을 증명하는 것으로, 임상검체에서 결핵균을 검출하는 것이다(American Thoracic Society, 2000; 김상재, 1993).

우리나라의 결핵 환자 진단 기준은 임상검체의 도말 검사 결과에서 항산균이 증명된 경우, 또는 결핵균이 분리 배양된 경우 중 하나만 충족하여도 결핵 환자로 진단하고 세균학적 검사에서 결핵균을 증명하지 못 할 경우에 한하여 임상적, 방사선학적 또는 조직학적으로 결핵에 합당한 증상이나 소견이 있어서 진료의사가 결핵 치료를 시행하기로 결정한 경우에는 의사환자로 진단할 수 있도록 정해져있다.(Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease, 1997).

객담 도말 검사는 시행이 간단하고 비용이 저렴하며, 결과가 빨리 나오고 전염성을 평가하는데 가장 중요한 검사법이나 민감도와 특이도가 낮은 단점이 있다. 배양검사는 적은 양의 결핵균도 검출할 수 있고 동정도 가능하여 가장 확실한 진단법이며 약제감수성 검사도 할 수 있는 장점이 있지만 시간이 오래 걸려(4-8주) 진단이 지연되는 단점이 있다. 이러한 도말 검사와 배양 검사의 단점을 보완 할 수 있는 polymerase chain reaction(PCR) 검사는 민감하고 신속하게 결핵균을 검출 및 동정할 수 있어 많이 사용되고 있다(American Thoracic Society, 1997).

PCR 검사는 도말검사나 배양검사에서 구분 못하고 배제되었던 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MT*B*)과 비정형 결핵균(nontuberculous mycobacteria, NTM)을 구분 할 수 있다는 장점이 있어 미국에서는 객담 항산균 도말검사에서 양성을 보인 경우에는 핵산증폭검사(nucleic acid amplification test)를 시행하여 이 검사에서 양성을 보일 때는 폐결핵으로 잠정 진단하고, 음성을 보

일 때는 NTM에 감염된 것으로 잠정진단 후 최종 진단은 배양결과를 가지고 판단하도록 권장하고 있다(Centers for Disease Control and Prevention, 2000).

NTM은 과거에는 비정형 결핵균(atypical mycobacteria), mycobacteria other than tuberculosis(MOTT), environmental mycobacteria, opportunistic mycobacteria 등으로 불리어오다, 최근에는 주로 NTM으로 지칭되고 있다(Ameriacn Thoracic Society, 1999; Falkinham JO 3rd., 1996). NTM은 토양과 하천 등 자연환경에 정상적으로 널리 분포하고 있어, 임상검체에서 분리되었을 때 대부분 오염균 또는 집락균으로 간주되어 왔다(Ameriacn Thoracic Society, 1999; Wolinsky, 1979). 하지만 1980년대 이후 미국과 유럽, 일본에서 후천성 면역결핍증 등 면역기능 저하 환자에서의 파종성 감염과 함께 기저질환이 없는 정상 면역상태인 성인에서 NTM 폐질환의 발생이 증가하면서 최근 많은 관심을 모으고 있다(O′*B*rien *et al*., 1987; Tuskamura *et al*., 1988; Yates *et al*., 1997). NTM 감염증은 폐질환, 림프절염, 피부질환, 파종성 질환 등 네가지 특징적인 임상 증후근으로 분류되며 이중 폐질환은 NTM 감염증의 90% 이상을 차지하는 가장 흔한 형태이다(Ameriacn Thoracic Society, 1997; Falkinham JO 3rd., 1996).

국내에서는 과거부터 NTM은 대부분 오염 또는 집락형성으로 간주하였고 따라서 임상적 의미를 별로 부여하지 않았다(Kim *et al*., 1968). 그러나 국내에서도 NTM이 증가하고 있으며(Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease, 1995), 최근 한 연구에서 항산균 도말 양성, 배양 양성 검체의 10.3%가 NTM으로 보고되기도 하였다(Koh *et al*., 2003).

최근에는 분자생물학적 방법의 발달에 따라 객담과 같은 임상 검체를 대상으로 결핵균 및 비정형 결핵균의 감별뿐만이 아니라 비정형 결핵균 동정 및 일부 결핵균 약제감수성까지도 확인할 수 있는 방법들이 개발되고 있다(Troesch, 1999; Helb, 2004).

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

제 2장 연구재료 및 방법

1. 검체

2005년 6월 중순 이후부터 2006년 2월 중순까지 수원시 소재의 한 대학병원에서 항산성 염색 결과 trace 이상의 양성으로 결과가 판독된 255개의 객담 검체를 사용하였다.

2. DNA 추출

PCR 실험을 위해 사용한 DNA 추출방법은 가열파쇄 유전자 추출법을 사용하였다. 항산성 염색시 원심분리하고 남은 약 500 ㎕ 이하의 객담을 1,500 ㎕용 microcentrifuge tube에 넣고 증류수 1,000 ㎕을 가해 9,000 rpm(약 5,000 g)에서 5분간 washing의 과정을 두 번 걸친 후 bottom부분에 남은 pellet에 증류수 100 ㎕을 넣고 100℃ 끓는 물에서 10분간 boiling 한 후 다음 단계로 넘어가기 전까지 동결시켜 보관하였다. 다음 단계에서 해동한 후 glass bead (Sigma-Aldrich, USA) 150 ㎕을 넣은 후 *B*ead beater (*B*iospec procects, OK, USA)로 bead beating (medium speed, 90초, 2회) 하였다. 100℃에서 10분간 boiling 한 후 13,000rpm(약 10,000 g), 1분간 원심 분리하였다.

3. PCR

1) 결핵균과 비정형 결핵균을 구분하기 위한 one-tube nested PCR

Genus mycobacteria 균종들의 *rpoB* 유전자 중 일부인 360 bp를 증폭하기 위해 primer로 5′ TCA AGG AGA AGC GCT ACG A 3′와 5' GCA GAC CCT GAT CAA CAT CC 3'를 사용하여 PCR 하였다. 증폭된 유전자 부위는 *M. tuberculosis*(Gen*B*ank accession No. P47766) 서열 순서 902에서 1261에 이르며 codon 302에서 420에 이른다.

동시에 190 bp 부분을 증폭하기 위한 primer로는 5' GGC ATC GAG GTG GCC AGA TG 3′와 5' CAT AGG TGA GGT CTG CTA CCC 3′를 사용하였다. PCR 반응액은 *AccuPower*® PCR premix (1 U *Taq* DNA polymerase, 250 μM dNTPs, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 40 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, Stabillizer, tracking dye), (*B*ioneer Co., Daejeon, Korea)를 사용하였고, genomic DNA 10 ㎕와 primer 각각 1 ㎕, 멸균증류수 36 ㎕를 혼합하여 최종부피가 50 ㎕가 되도록 혼합물을 만들었다.

PCR은 Thermal cycler (GeneAmp PCR system 2700, Perkin-Elmer Cetus, *B*oston, MA, USA)를 사용하였고, 실험에 사용된 PCR방법은 다음과 같다.

Pre-denaturation 과정으로 94℃에서 5 분간 1 cycle 시행후, denaturation 과정을 94℃ 에서 30 초, annealing/elongation 과정을 72℃에서 1 분간 15 cycle 시행 첫 번째 PCR target인 190 bp를 증폭하였으며, 계속해서 denaturation 과정을 94℃ 에서 30 초, annealing 과정을 58℃ 에서 30 초, elongation 과정을 72℃ 에서 30 초 시행하는 두 번째 PCR 과정을 35 cycle 시행하여 360 bp의 PCR 산물을 증폭하였다. 최종 elongation은 72℃에서 7 분간 실시하였다.

각 과정에서 양성 및 음성대조군, PCR size marker(M & D, Korea)를 항상 사용하였다. *M. tuberculosis* 양성 대조군으로는 H37Rv, nontuberculous mycobacteria 양성대조군으로는 *M. smegmatis*를 사용하였으며, 음성 대조군에는 검체의 DNA양에 해당하는 만큼의 멸균증류수를 대신하여 넣었다. PCR 이후에는 1.5% (w/v) T*B*E agarose gel (*B*ioneer Co., Daejeon, Korea)과 0.5 × T*B*E buffer(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 조성된 agarose gel 위에 PCR DNA size marker 10㎕와 PCR 산물 5 ㎕를 각각 점적하여 100 V에서 20분간 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 ethidium bromide(Et*B*r)로 10 분 염색, 수돗물로 10 분 탈색 후 UV transilluminator(Vilber Louramat, Mame La Valle, France)를 이용하여 전기영동 결과를 확인하였다.

2) 결핵균의 확인을 위한 two-tube nested PCR

(1) First PCR

PCR 반응액은 앞서 기술한 *AccuPower*® PCR premix를 사용하였고, genomic DNA 5 ㎕와 MT*B*의 16S-23S rDNA intergenic spacer region만을 증폭하기 위한 primer로 5' GGG GCG TAG GCC GTG AGG GGT TCT T 3′와 5' ATT GCA CAA AGA ACA CGC CAC CGC TG CC 3′를 각 1 ㎕를 첨가하였고, internal control DNA 3 ㎕를 넣고 멸균증류수 10 ㎕를 넣어 최종 부피가 20 ㎕가 되게 하였다. PCR 과정은 pre-denaturation 94℃ 5 분 1 cycle, denaturation 94℃ 30 초, annealing 68℃ 30 초, elongation 72℃ 30 초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72℃ 7 분 1 cycle을 시행하였다.

(2) Second PCR

PCR 반응액은 앞서 기술한 *AccuPower*® PCR premix를 사용하여 first PCR product 2 ㎕, 5' CTT GTC TGT AGT GGG CGA GA 3′와 5' TAG CCG GCA GCG TAT CCA TT 3′의 염기서열을 갖는 nested PCR용 primer를 각각 1 ㎕씩 첨가하였고 멸균증류수 16 ㎕를 넣어 최종 부피가 20 ㎕가 되게 하였다.

PCR 과정은 pre-denaturation 과정을 94℃에서 1 cycle, denaturation 과정을 94℃에서 30 초, annealing 과정을 72℃에서 30초, elongation 과정을 72℃에서 30 초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72℃ 7 분 1 cycle을 수행하였다. 이하 전기영동 및 염색 그리고 결과확인은 앞서 기술한 것과 동일하게 시행하였다.

3) 동정을 위한 PCR

Genus mycobacteria의 동정을 위한 *rpoB* 유전자를 증폭하기 위해 앞서 기술한 5′TCA AGG AGA AGC GCT ACG A 3′와 5' GCA GAC CCT GAT CAA CAT CC 3'의 각 primer가 포함된 *AccuPower*® PCR premix를 사용하였고 genomic DNA 10 ㎕, 멸균증류수 40 ㎕를 넣고 최종 부피가 50 ㎕가 되게 만들었다.

PCR 과정은 pre-denaturation 과정을 94℃에서 5 분간 1 cycle, denaturation 과정을 94℃에서 20 초간, annealing 과정을 58℃에서 20 초간, elongation 과정을

72℃에서 30 초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72℃ 10 분 1 cycle로 수행하였다.

전기영동, 염색, 결과판독은 앞서 기술한 방법으로 시행하고, PCR 산물이 약한 경우, 또는 증폭되지 않은 경우나 비특이적 밴드가 나타난 경우에는 별도로 다음의 PCR을 시행하였다.

Primer sequence가 5′ TCA AGG AGA AGC GCT ACG ACC T 3′와 5′ GCC GCA GAC CCT GAT CAA CAT CC 3′ 되는 10 pmole nested PCR용 primer 각각 1 ㎕, 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate 2 ㎕, 10x *Taq* buffer 5 ㎕, *Taq* polymerase(5U/㎕) 0.5 ㎕, PCR products 2 ㎕, 멸균증류수 39.5 ㎕를 넣어 최종 부피가 50 ㎕가 되게 하였다.

PCR 과정은 pre-denaturation 94℃ 5 분 1 cycle, denaturation 94℃ 30 초, annealing 72℃ 30 초, elongation 72℃ 30 초의 과정을 35 cycle, 최종 elongation 72℃ 10 분 1 cycle로 수행하였다.

전기영동, 염색, 결과판독은 먼저 기술한 방법으로 시행하였다.

4. PCR-RFLP

Mycobacteria 분류를 위하여 성공적으로 증폭된 PCR 산물 15 ㎕에 *Msp* I (*B*oehringer Manheim *B*iochemicals, Germany) 0.5 ㎕(10U/㎕), 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 효소 반응액(10 ㎕)을 4% Metaphor T*B*E agarose gel(FMC, *B*ioproducts, Maine)에 점적한 후 100 V에서 60~75 분간 전기영동 탱크에 얼음을 담아 전기영동하였다.

Gel을 Et*B*r로 염색 한 후 UV transilluminator로 분절편을 확인하였다. 결과판독은 mycobacteria 동정 알고리즘(Fig. 1)을 참고하여 균을 동정하였다(Lee *et al.*, 2000).

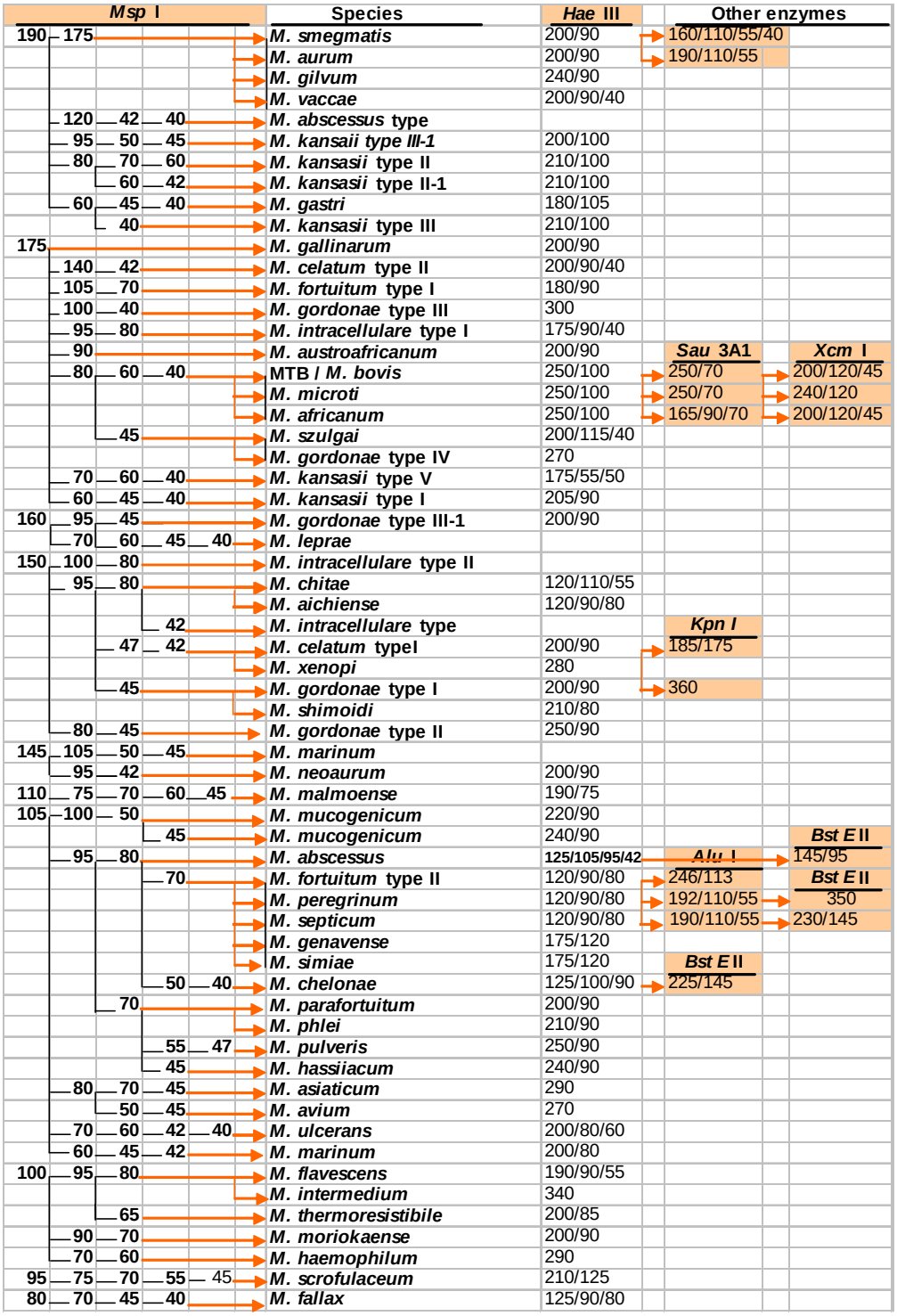

Fig. 1 : Algorithm for mycobacterial identification

제 3 장 결 과

1. 항산성 염색과 one-tube nested PCR의 비교

Mycoabcteria가 공통적으로 가지고 있는 *rpoB* 유전자의 360 bp 부분과 mycobacteria 중 결핵균만 가지고 있는 *rpoB* 유전자의 190 bp 부분을 이용하여 MT*B*와 NTM을 구분하기 위하여 one-tube nested PCR을 시행하였다. 그 결과 MT*B*는 360 bp와 190 bp의 두 개, 혹은 190 bp 부분의 밴드를 나타내는데 비하여 NTM은 360 bp의 한 개 밴드만을 보이게 되어 구별이 가능하였다(Fig. 2).

항산성 염색 결과가 trace인 56 검체로 PCR을 시행한 결과 MT*B*가 42, NTM이 3, 음성이 11검체에서 확인되었고, 항산성 염색 결과가 1+인 116 검체 중 MT*B*가 95, NTM이 2, 음성이 19검체에서 확인되었으며 또한, 항산성 염색 결과가 2+인 66 검체 중 MT*B*가 62, 음성이 4검체에서 확인되었다. 항산성 염색 결과가 3+인 17 검체는 모두 MT*B*로 검출되었다(Table 1).

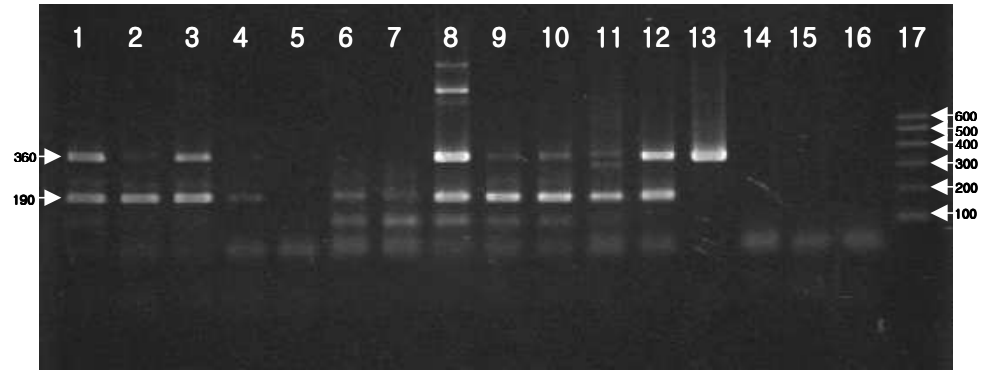

Fig. 2. PCR amplification of clinical isolates using one-tube nested PCR for detection of *M. tuberculosis* and NTM. Amplified MT*B* size is 190 bp and amplified NTM size is 360 bp. Lane 1 - 11 : clinical isolates, lane 12 : MT*B* control, lane 13 : NTM control, lane 14 - 16 : negative controls, lane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

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

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

D/R : Detection rate

2. 항산성 염색과 two-tube nested PCR의 비교

Mycobacteria의 세균수가 적은 검체로부터 유전자를 증폭할 경우에는 one-tube nested PCR로는 검출이 용이하지 않은 경우가 있다. 여기서는 이러한 부분을 보완할 수 있는 방법으로 two-tube nested PCR을 시행하였다. 본 실험에서는 two-tube nested PCR의 대상을 one-tube nested PCR 결과 음성으로 판독된 검체를 대상으로 하였다. PCR 반응에서 16S-23S rRNA intergenic 부위(500 bp)를 1차 PCR에서 증폭하였다. 이어 1차 PCR 산물의 일정부위(185 bp)가 증폭되었는지를 전기영동 하여 확인할 수 있었으며 PCR 반응을 저해하는 저해제의 존재여부도 500 bp 상당하는 부분의 분획 유무에 따라 판단할 수 있었다(Fig. 3).

그 결과 항산성 염색 trace인 11 검체 중 MT*B*가 4, 음성이 6, 항산성 염색 결과가 1+ 19 검체 중에서 MT*B*가 9, 음성이 5검체에서 확인되었으며, 항산성 염색 결과가 2+인 4 검체 중 MT*B*가 3검체에서 확인되었다(Table 2). 이 중 inhibitor가 발견된 검체는 항산성 염색 trace에서 1, 항산성 염색 1+인 검체에서 5, 항산성 염색 2+인 1개의 검체에서 발견되었다.

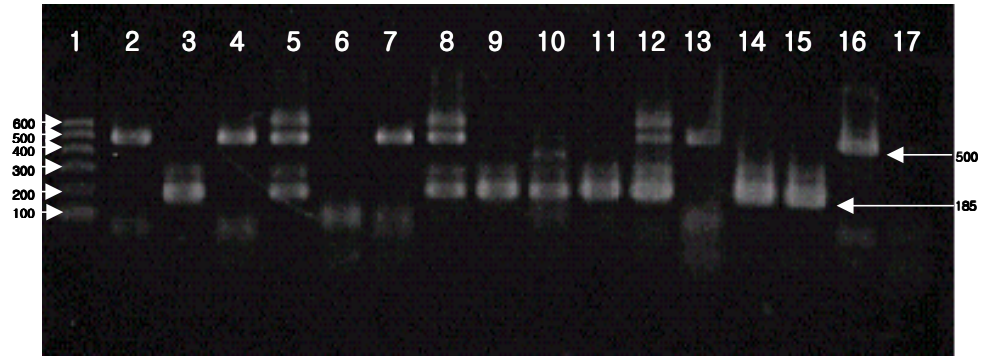

Fig. 3. PCR amplification of clinical isolates using two-tube nested PCR for detection of *M. tuberculosis*. Amplified MT*B* size is 185 bp and amplified internal control size is 500 bp. Lane 1 : PCR size marke,r lane 2 - 14 : clinical isolates, lane 15 : MT*B* control, lane 16 : NTM control, lane 17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

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

AF*B*	No. of sample	MT*B*	Inhibitor	Negative
±	11	4	1	6
1+	19	9	5	5
2+	4	3	1	-
3+	-	-	-	-
Total	34	16	7	11

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

항산성 염색 결과가 trace 이상인 결과를 가진 검체에 대해 PCR 방법과의 비교를 위해 one-tube nested PCR 및 two-tube nested PCR을 시행한 결과 MT*B*, NTM 및 음성의 결과로 좀 더 세분화 된 결과를 얻을 수 있었다. one-tube nested PCR에서는 MT*B*와 NTM의 구별을, two-tube nested PCR에서는 MT*B*의 존재여부를 구분하여 이 둘을 종합하여 결과를 확인 할 수 있었다(Table 3).

항산성 염색 결과가 trace인 56 검체 중 MT*B*가 46, NTM이 3, negative가 7검체에서 확인되었으며, 항산성 염색 결과가 1+인 116 검체 중에서 MT*B*가 104, NTM이 2, negative가 10검체에서 확인되었다. 또한, 항산성 염색 결과가 2+인 66 검체 중 MT*B*가 65, negative가 1검체에서 확인되었고, 항산성 염색 결과가 3+인 17검체는 모두 MT*B*로 검출되었다. 이상의 결과에서 총 항산성 염색 결과를 가진 255 검체에서 MT*B*가 232검체에서 확인되었으며, NTM이 5검체에서 확인되었다. 또한, negative가 18검체에서 확인되었다.

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

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

D/R : Detection rate

4. PCR-RFLP를 이용한 mycobacteria의 동정

one-tube nested PCR 및 two-tube nested PCR을 사용하여 얻은 결과를 바탕으로 NTM, 음성 및 저해제의 존재를 알 수 있었던 23 검체에 대하여 PCR-RFLP를 시행하였다. 그 과정에서 *rpoB* gene의 360 bp 부분을 확인 할 수 있었고(Fig. 4), 여기에 *Msp* I 을 첨가하여 동정결과를 확인 할 수 있었다(Fig. 5). 그 결과 17 검체에서 negative, 1 검체에서 weak positive의 결과를 얻을 수 있었으며 동정이 된 균은 *M. avium*과 *M. intracellulare*로 Table 4와 같았다.

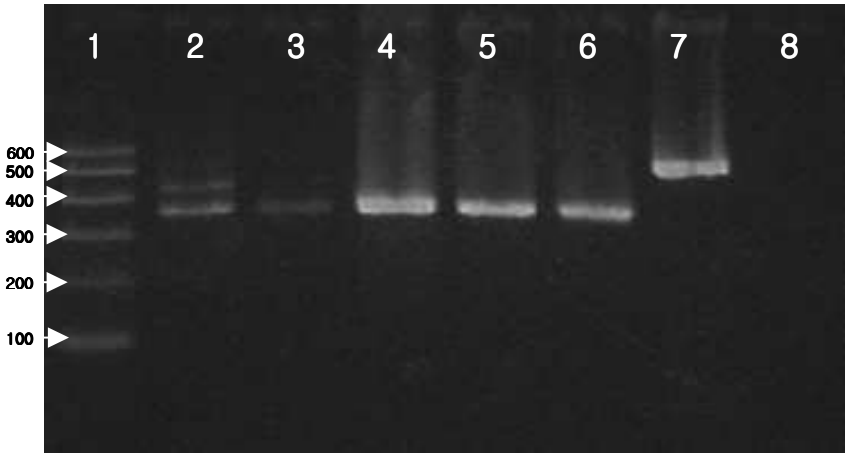

Fig. 4. PCR amplification of clinical isolates using two-tube nested PCR for identification of NTM. Amplified MT*B* size is 360 bp and amplified PCR positive control size is 520 bp. Lane 1 : PCR size marker, lane 2 - 6 : clinical isolates, lane 7 : positive control, lane 8 : negative control.

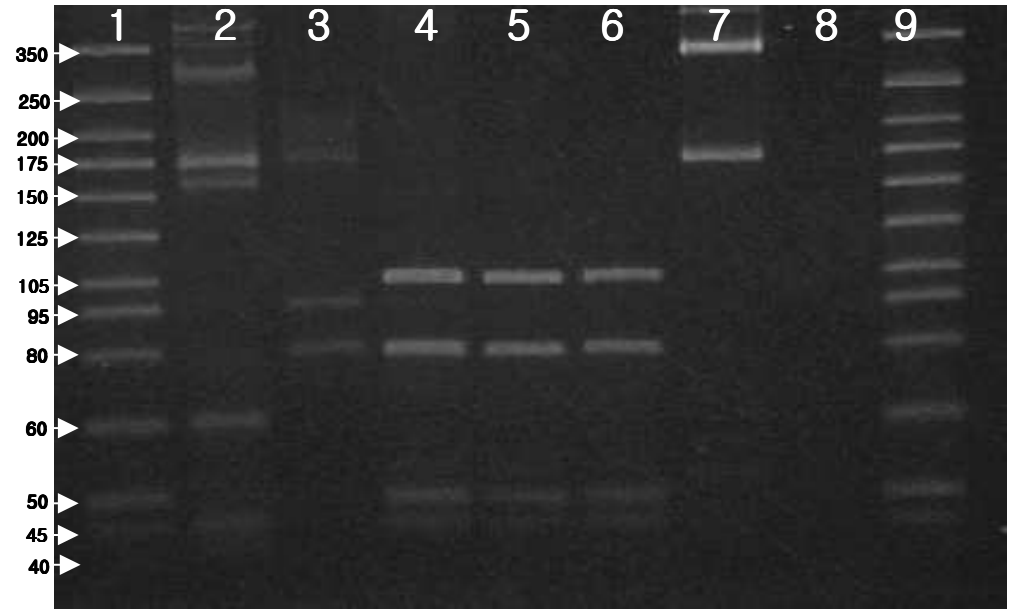

Fig. 5. PCR-RFLP analysis for identification of mycobacterial clinical isolates Lane 1, 9 : PCR size marker, lane 2 - 6 : clinical isolates, lane 7 : positive control, lane 8 : negative control.

Table 4. Nontuberculous mycobacterial species identified from acid fast stain positive clinical isolates

Lane	Identified species	PCR product size(bp)	DNA fragment size(bp)
2	Unidentified	360	175, 60, 45
3	*M. intracellulare*	360	175, 95, 80
4	*M. avium*	360	105, 80, 50, 45
5	*M. avium*	360	105, 80, 50, 45
6	*M. avium*	360	105, 80, 50, 45
7	Positive control	520	350, 175
8	Negative control	0	0

제 4 장 고 찰

항산균 염색을 이용한 객담 도말검사는 결핵균과 NTM을 구별할 수 없다는 제한점이 있어(American Thoracic Society, 2000) 본 실험에서는 이러한 단점을 가지고 있는 기존의 검사법을 대신하여 요즈음 새로이 사용하고 있는 분자생물학적 방법을 이용하여 도말 방법과 비교하여 보았다.

그 결과 *rpoB* gene을 이용한 one-tube nested PCR법은 소요시간도 짧고 결과에서도 MT*B*와 NTM의 구별이 가능한 방법으로 확인되어 PCR 검사가 결핵균과 NTM을 신속히 구분하는데 유용함을 다시 한번 확인할 수 있었다(Lee *et al.*, 2005). 검출률은 약 87%의 결과를 보여주었다. 또한 이 방법에서는 검출되지 않았던 34검체에 대해 16S-23S rRNA spacer gene을 이용한 two-tube nested PCR법을 이용하여 실험한 결과 검출률이 93%까지 올라감이 확인되었다. 그러나 93%까지 검출률을 올렸던 16S-23S rRNA spacer gene을 이용한 방법에서는 *rpoB* gene을 이용한 방법이 MT*B*와 NTM을 구분할 수 있었던 것에 비해 MT*B*의 유무 및 PCR 저해제의 유무만을 확인 할 수 있었다는 단점이 있다. 이 부분은 앞으로 지속적인 연구를 통해 보완해 나가야 할 부분이라 생각된다. 또한 도말결과와 배양결과를 함께 가지고 PCR법과 비교하여 민감도 및 특이도를 비교했던 실험에 비해(Lee *et al.*, 2005) 본 실험에서는 도말결과만을 가지고 있어 앞으로 실험에서 배양결과를 추가하는 실험을 하여 결과를 보완하고 비교할 수 있어야 할 것으로 생각된다.

NTM 폐질환을 일으키는 비율은 미국, 캐나다 및 서유럽에서는 객담에서 NTM이 분리되는 사람 중 약 40-50%(O'*B*rien *et al.*, 1987; Good *et al.*, 1982), 홍콩, 일본 등 아시아 국가에서는 약 10-20%(Sakatani, 1999; Hosker *et al.*, 1995)로 보고되고 있다. 우리나라에서는 1980년대 NTM 폐질환에 대한 몇몇 증례보고(김상재 등, 1981; 김상재 등, 1982; 김형중 등, 1985)에 이어 1990년 이후 임상검체에서 배양된 NTM의 균종별 분포(류우진 등, 1992; 배길한 등, 1993; Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease, 1995)와 실제 폐질환을 가진 환자들에

서의 원인균의 분포(류우진 등, 1992; 배길한 등, 1993)에 대한 몇몇 연구가 이루어졌다. NTM증 전국 실태조사에 의하면 1990년 이후 NTM의 분리율 및 질병 빈도가 빠른 속도로 증가하고 있음을 알 수 있다(Scientific Commette in Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases other than tuberculosis in Korea, 1995). 미국과 달리 국내의 경우 결핵의 유병률과 발생률이 높고 비결핵 항산균 폐질환의 빈도가 낮아 객담에서 항산균 도말 양성일 경우 대부분 결핵으로 간주하여 왔으며, 균 배양 후에도 결핵균과 비결핵 항산균을 구별하고 있는 검사실은 매우 소수인 실정이다(Kim *et al.*, 1999). 따라서 PCR 검사는 주로 항산균 도말 음성 환자에서 결핵이 의심될 경우 진단의 민감도를 높이기 위하여 실시되어 왔다(*B*ack *et al.*, 2001). 그러나 국내에서도 비결핵 항산균증이 증가하고 있으며(Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease, 1995) 최근 한 연구에서 항산균 도말 양성, 배양 양성 검체의 12.2%가 비결핵 항산균임이 보고되기도 하였다(Lee *et al.*, 2005).

본 실험에서는 도말 양성 검체에 대해 PCR을 통한 NTM의 분리를 실시하였고 그 비율이 2.1%에 그쳐 그간 국내외의 많은 연구결과에 비해 NTM의 분리 비율이 상당히 낮은 결과를 얻었다. 이러한 낮은 분포의 원인으로는 첫째, 실험기간이 상대적으로 짧았던 것을 원인으로 들 수 있을 것이다. 도말 양성 객담 중 NTM 분리비율이 1997년 하반기 6.5%에서 2001년 상반기 10.8%, 2001년 하반기17.8% 등으로 최근 4.5년간 지속적으로 증가하고 있음을 확인했던 실험(Koh *et al.*, 2003)에 비해 실험기간이 상대적으로 짧았다. 이는 본 실험의 NTM 분리 비율이 실제로 낮은 수준을 보여주는 것인지 단지 일시적인 감소현상을 보여주는 것이었는지 앞으로 지속적인 실험관찰을 통하여 확인해 보아야 할 것으로 생각된다. 둘째, 지역적인 폐쇄성을 고려해 보아야 할 것이다. 4.5년간 증가의 추세를 보여줬던 병원은 전국적인 환자가 내원하는 3차 병원인 것에 비해 본 실험의 검체가 모여진 병원은 지역적인 특색을 갖는 2차 병원이라는 것이다. 실제로 미국에서의 한 예를 보면 지역과 보고된 시기에 따라 항산균 도말양성 객담에서 NTM의 분리비율이 낮게는 1.7%(Lipsky *et al.*, 1984), 3.5%(Gordin *et al.*, 1990), 8.5%(Yajko *et al.*, 1994) 등으로 보고되고 있지만, 최근 보고에 의하면 Colorado 지역에서는

24.8%(Stone *et al.*, 1997), Texas 지역에서는 48.5%(Wright *et al.*, 1998)까지 항산균 도말양성 객담에서 NTM이 분리된다고 한다.

미국과 일본에서 NTM 폐질환의 가장 흔한 원인균은 *M. avium* complex(MAC)로 60-80%를 차지하며(O'*B*rien *et al.*, 1987; Tsukamura *et al.*, 1988), 우리나라에서도 NTM 폐질환 원인균의 50-60%를 차지하고 있다(고원중 등, 2003; 류우진 등, 1992; 배길한 등, 1993; Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease, 1995). MAC 감염증에서 구체적인 원인균은 환자의 기저질환에 따라 다르다. 후천성 면역결핍증 환자에서는 MAC 감염증이 주로 파종성 질환으로 발생하며 원인균으로 *M. avium*이 90% 이상을 차지하지만(American Thoracic Society, 1997; Horsburgh, 1989), 면역저하가 없는 환자에서 MAC 감염증은 주로 폐질환으로 발생하며 70% 이상이 *M. intracellurare*에 의해 발생한다(Wallace *et al.*, 1998; Obayashi *et al.*, 1998). 또 다른 국내의 연구에 의하면 MAC 중에서 *M. intracellulare*가 국내 NTM 폐질환의 더 흔한 원인균이라고 한다(Koh *et al.*, 2004). 본 실험에서도 분리된 NTM을 동정한 결과 *M. avium, M. intracellurare*가 분리되어 위의 연구자들이 밝힌 사실을 확인하였다.

이상의 결과에서 살펴보았듯이 폐결핵의 진단에 있어 NTM의 구분 및 동정이 중요시 되고 있다. 본 실험에서 동정되어 밝혀진 *M. avium* 및 *M. intracellulare*를 보유한 환자의 치료경과를 보면 폐결핵으로 진단되어지고 결핵 약제를 복용했던 기록들이 있다. 그러나 그 경과가 좋지 않아 균종 동정에 들어가고 그 결과 NTM으로 판명 및 동정되어 그에 대처하는 새로운 약제가 투여되고 있는 것이 확인되었다. 본 실험에서는 낮은 수준의 NTM 분리비율이 나왔지만 국내의 다른 연구에서는 10%이상의 NTM 분리비율이 나타나고, 그 추세가 증가 되는 현상을 보이고 있다는 것(Koh *et al.*, 2003)을 고려할 때 NTM의 분리와 동정의 중요성을 잃지 말아야 할 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서는 분자생물학적 방법을 이용하여 *rpoB* 유전자를 이용한 PCR-RFLP 방법을 이용하였으나, 이러한 방법에서 약 3%정도에서 균동정이 안되고 있는 것으로 알려져 있다(Hong *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). 본 실험에서도 동정이 안 된 한 검체가 있는 것이 확인되었다.

이러한 경우 두 가지 이상의 NTM이 분리되는 것이 아닌지 확인해야 할 것으로

생각된다. 실제로 일부 환자에서는 두 가지 이상의 NTM이 분리되어, 원인균을 잘 못 판단할 수 있다고 하였다(Koh *et al.*, 2004).

결론적으로 호흡기 검체로부터 결핵균과 NTM을 구분함에 있어, NTM의 비율이 높게 변화되어가는 추세를 알아야 할 것이며, NTM의 구분에 PCR을 이용한 방법이 신속하다는 것을 확인하였다(Lee *et al.*, 2005). 호흡기 검체에서 NTM이 분리된 사실 자체가 NTM 폐질환이 있다는 뜻은 아니므로(Koh *et al.*, 2004), 분리되어지는 NTM에 대하여는 동정이 이루어져야 할 것이다. 동정이 된 NTM은 그 균종에 따른 발병력의 차이가 있어 MAC를 비롯한 *M. kansasii, M. chelonae/abscessus* 등이 발병력이 높은 편이고, 상대적으로 *M. fortuitum complex*는 발병력이 낮다는(O'Brien *et al.*, 1987) 것을 참고하여야 할 것이라 생각된다. 이렇게 동정이 되어진 결과는 절대적으로 신뢰하기 보다는 약 3% 정도의 PCR-RFLP 법에서 동정이 안되고, 2가지 이상의 NTM 감염 가능성에 대해서도 생각해 보아야 할 것이라 생각된다. 실험의 대상자를 조사한 것에서 알 수 있듯이 NTM에 대한 신속한 발견을 통해 적절한 약제를 투여함으로써 환자의 고통과 시간적, 경제적 낭비를 줄일 수 있으리라 생각된다.

제 5 장 결 론

결핵의 진단에 널리 많이 사용되어지는 항산성 염색 방법이 MT*B*와 NTM을 구분 하지 못한다는 단점과, 배양 방법의 시간이 오래 걸린다는 단점을 보완할 수 있는 방법으로서 분자생물학적방법인 PCR을 시행하였으며 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. one-tube nested PCR 및 two-tube nested PCR을 시행하여 MT*B* 232, NTM 5의 결과를 확인하여 MT*B* 및 NTM의 분리비율이 97.9% : 2.1%임을 확인하였다.

2. 255검체를 대상으로 one-tube nested PCR을 시행하여 221검체에 대하여 MT*B* 및 NTM을 확인하여 약 87%의 검출률을 확보하였다. 한편, 음성으로 판독된 34검체에 대하여 two-tube nested PCR을 시행한 결과 16개의 MT*B*를 추가로 확인하여 검출률을 약 93%까지 향상시킬 수 있었다.

3. NTM으로 분리된 5검체에 대하여 PCR-RFLP를 이용한 균동정을 실시한 결과 발병력이 높은편인 *M. avium*과 *M. intracellulare*를 확인하였다.

4. *M. avium*과 *M. intracellulare*를 가지고 있던 환자들의 임상기록을 살펴본 바에 의하면 결핵에 의한 약제 투여 후 외부기관에 mycoabcteria 동정을 의뢰한 결과 NTM으로 확인 되어 적절한 약제로 바꾸어 투약하고 있다는 사실이 밝혀졌다. 이러한 사실은 본 실험에서 사용한 PCR 방법과 같이 신속하고 정확하게 MT*B*와 NTM을 감별하고 정확한 mycobacteria 균종을 동정하는 분자생물학적 방법의 유용성을 다시 한번 확인시켜주는 것이었다.

참 고 문 헌

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

American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:S1-S25.

American Thoracic Society. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? American Thoracic Society workshop. Am J Respir Crit Care Med 1997;155;1804-1814.

*B*ack SH, Lee JM, Kang MJ, Son JW, Lee SJ, Kim DK. How reliable is sputum PCR test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis when sputum smear is negative? Tuberc Respir Dis 2001;50:222-228.

*B*loom *B*R, and Murray CJL, Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science. 1992;257:1055-1064.

*B*ritish Thoracic Society. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committe guidelines 1999. Thorax 2000;55:210-218.

Centers for Disease Control and Prevention. Update: Nucleic acid amplication tests for tuberculosis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2000;49:593-594.

Good RC, Snider DE Jr. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States, 1980. J. Infect Dis 1982;146:829-833.

Gordin F, Slutkin G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Arch Pathol Lab Med 1990;114:1025-1027.

Helb D, Jones M, Paul K, Levi M, McMillan W. Integrating sputum processing with real-time PCR cetection, *q*uantiation, and susceptibility testing of *M. tuberculosis* into single, rapid hands-free step. Am J Respir Crit Care Med

2004;170:A259.

Hong SK, Kim *B*J, Yun YJ, Lee KH, Kim EC, Park EM. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-linked reverse hybridization using specific *rpoB* oligonucleotide probes. J Microbiol Methods 2004;59:71-79.

Horsburgh CR Jr, Selik RM. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the ac*q*uired immunodeficiency syndrome (AIDS). Am Rev Respir Dis 1989;139:4-7.

Hosker HS, Lam CW, Ng TK, Ma HK, Chan SL. The prevalence and clinical significance of pulmonary infection due to non-tuberculous mycobacteria in Hong Kong. Respir Med 1995;89:3-8.

Kim *B*J, Hong SK, Lee KH, Yun YJ, Kim EC, Park YG. Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol 2004;42:1308-1312.

Kim JS, Kim W*B*, Suh JJ, Hah YM, Kim YM. Scotochromogens from tuberculosis patients. Korean J Pathol 1968;2:39-43.

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.

Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tuberic. 1991;72:1-6.

Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in immumocompetent patients. Korean J Radiol 2002;3:145-157

Koh WJ, Kwon OJ. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. Tuberc Respir Dis 2004;56:5-17.

Koh WJ, Kwon OJ, Yu CM, Jeon K, Suh GY, Chung MP, Kim H, Han SW, Park SY, Lee NY. Recovery rate of non-tuberculous mycobacteria from acid-fast bacilli smear-positive sputum specimens. Tuberc Respir Dis

2003;54:22-32.

Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease, Diagnostic standards of pulmonary tuberculosis. Tuberc Respir Dis 1997;44:1447-1453.

Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease. National survey of mycobacterial diesease other than tuberculosis in Korea. Tuberc Respir Dis 1995;42:277-294.

Lee HY, Park HJ, Cho SN, *B*ai GH, Kim SJ. Specific identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. J. Clin. Microbiol. 2000;37:1714-1720.

Lee JS, Ji HS, Hong S*B*, Oh YM, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Shim TS. Clinical utility of polymerase chain raction for the differentiation of nontuberculous mycobacteria in patients with acid-fast bacilli smear-positive specimens. Tuberc Respir Dis 2005;58:452-458.

Lee JY, Choi HJ, Lee HY, Joung EY, Huh JW, Oh YM, Lee SD, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Shim TS. Recovery rate and characteristics of nontuberculosis mycobacterial isolates in a university hospital in Korea. Tuberc Respir Dis 2005;58:385-391.

Levy H, Feldman C, Sacbo H, ban der Meulen H, Kallenbach J, Koomhof H. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 1989;95:1193-1197.

Lipsky *B*A, Gates J, Tenover FC, Plorde JJ. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. Rev Infect Dis 1984;6:214-222.

Obayashi Y, Fujita J, Suemitsu I, Kamei T, Nii M, Takahara J. Clinical features of non-tuberculous mycobacterial disease: comparisons between smear-positive and smear-negative cases, and *mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellilare*. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:597-602.

O'*B*rien RJ, Geiter LJ, Snider DE Jr. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial disease in the United States: result from a national survey.

Am Rev Respir Dis 1987;135:1007-1014.

Sakatani M. Nontuberculous mycobacteriosis; the present status of epidemiology and clinical studies. Kekkaku 1999;74:377-384.

Scientific Commette in Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory. Diseases other than tuberculosis in Korea. Tuberc Respir Dis 1995;42:277-294.

Snider, DE, and La Montagna JR. The neglectesd global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress in Tuberculosis. J. Infect Dis. 1994;169:1189-1196.

Stone *B*L, *B*urman WJ, Hildred MV, Jarboe EA, Reves RR, Wilson ML. The diagnostic yield of acid-fast bacillus smear-positive sputum specimens. J Clin Microbiol 1997;35:1030-1031.

Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gineras TR, Kaplan PM. *Mycobacterium species* identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. J Clin Microbiol 1999;37:49-55.

Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, Arakawa H, Kuze A. Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. Am Rev Respir Dis 1988;137:1280-1284.

Wallace Jr, Zhang Y, *B*rown *B*A, Dawson D, Murphy DT, Wilson R, Griffith DE. Polyclonal *Mycobacterium avium* complex infections in patients with nodular bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:1235-1244.

Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated disease. Am Rev Respir Dis 1979;119:107-159.

World Health Organization, Global Tuberculosis Programme. Treatment of Tuberculosis: Guidelines for national programmers. 2nd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1997.

Wright PW, Wallace Jr., Wright NW, *B*rown *B*A, Griffth DE. Sensitivity of fluorochrome microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis*

versus nontuberculous mycobacteria. J Clin Microbiol 1998;36:1046-1049.

Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA, Madej JJ, Hadley WK. High predictive value of the acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis* despite the high prevalence of *Mycobacterium avium* complex in respiratory specimens. Clin Infect Dis 1994;19:334-336.

Yates MD, Pozniak A, Uttley AHC, Clarke R, Grange JM. Isolation of environmental mycobacteria from clinical specimens in South-East England: 1973-1993. Int J Tuberc Dis 1997;1:75-80.

고원중, 권오정, 함형석, 서지영, 정만표, 김호중, 한대희, 김태성, 이경수, 이남용, 박은미, 박영길, 배길한. 호흡기 검체에서 분리된 비핵성 마이코박테리아의 임상적 의의. 대한내과학회지 2003;65:10-21.

김상재. 제10장 결핵균 검사. 대한결핵협회, 대한결핵 및 호흡기학회. 결핵. 4판. 서울 : 대한결핵협회, 대한결핵 및 호흡기학회;1993, 96-117.

김형중, 오승헌, 이원영, 김상재, *Mycobacterium chelonei* subsp. *abscessus*에 의한 1예. 결핵 및 호흡기질환 1985;32:54-57.

김상재, 홍영표, 김성진, 배길한, 진병원, 박중도, *Mycobacterium avium-intracellulare* complex에 의한 폐항산균증 1예. 결핵 및 호흡기질환 1981;28:121-124.

김상재, 홍영표, 배길한, 김성진, 진병원, 정충모. *Mycobacterium avium-intracellulare* complex와 *M. fortuitum*에 의한 폐항산균증 3예. 대한미생물학회지 1982;17:87-93.

류우진, 안동일, 윤영자, 조정섭, 권동원, 김상재. 비결핵성마이코박테리엄증의 임상경험. 결핵 및 호흡기질환 1992;39:425-432.

배길한, 박관숙, 김상재. 1980년부터 1990년까지 우리나라의 결핵균의 마이코박테리아 균종별 감염 양상. 대한미생물학회지 1993;28:1-5.

Abstract

Detection, differentiation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria by PCR assay using acid fast bacilli staining-positive specimens

Lee, Seong Deok
Dept. of *B*iomedical Life Science
The Graduate School of Health and Environment
Yonsei University

The method of acid fast bacilli(AF*B*) staining which is commonly used to diagnose tuberculosis takes a short amount of time and is economical. However, it also accommodates the disadvantage of not being able to discriminate *Mycobacterium tuberculosis*(MT*B*) from nontuberculous mycobacteria(NTM). In contrast, the method of culturing has the advantages. It can differentiate MT*B* from NTM, identify NTM species, and is sensitive. However, the culture method also has disadvantage since it takes long time(4-8 weeks). This study was set to evaluate the usefulness of direct PCR for rapid detection of MT*B*, differentiation of MT*B* from NTM, and

identification of NTM species using AF*B* staining-positive specimens. The specimens used in this experiment were a total of 255 AF*B* staining-positive respiratory specimens that were obtained from a domestic university hospital. First of all, for the differentiation of MT*B* from NTM from AF*B* staining-positive specimens, the bands of 360 bp which exists both in MT*B* and in NTM, and 190 bp which exists only in MT*B* and not in NTM thus are able to differentiate MT*B* from NTM were amplified using the one-tube nested PCR targeting regions of the *rpoB* gene. As a result, detection rate of MT*B* and NTM was 87% after the one-tube nested PCR. Subse*q*uently, the two-tube nested PCR targeting 16S-23S rRNA spacer gene was done with 34 specimens that were negative by one-tube nested PCR, and the results showed the detection range of MT*B* and NTM increased upto 93%. Then, specimens that were detected to be NTMs were subse*q*uently subjected for PCR-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) analysis based on the *rpoB* gene for mycobacterial species identification. In brief, the results of PCR-RFLP analysis identified those NTMs to be *M. avium* and *M. intracellulare*. *B*y follow-up investigations of the medical history of those patients who were determined to had the mycobacterial species, it was revealed that after a length of chemotherapy with standard anti-T*B* drugs, there was no improvement in their states, so physicians underwent identification of mycobacteria. And finally it was determined that those patients indeed had NTMs and not MT*B*. *B*ased on the identification data, physicians changed regimens for patients to be more effective to treat NTM. Therefore, this result seems to strongly suggests that the PCR testing especially aming for differentiation of MT*B* from NTM, and identificatin of mycobacterial species using AF*B* stgaining-positive specimens would be highly importnat in clinical settings for effective treatment of patients.

Key Words : MT*B*, NTM, Acid -Fast *B*acilli, PCR, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)