

5년간 울산대학교병원에서 HPLC법을 이용한 Mycobacteria의 동정과 균종 분포

정윤성¹ · 김성률¹ · 장철훈² · 이선희¹

울산대학교병원 진단검사의학교실¹, 부산대학교 의과대학 진단검사의학교실²

Identification of Mycobacteria Species by HPLC and Species Distribution during Five Years at Ulsan University Hospital

Joseph Jeong, M.D.¹, Sung-Ryul Kim, M.D.¹, Chulhun L. Chang, M.D.², and Seon Ho Lee, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine¹, Ulsan University College of Medicine, Ulsan; Department of Laboratory Medicine², Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea

Background : Infections caused by mycobacteria have been significantly increasing. Due to the difficulty of making a decision about the pathogenicity of mycobacteria, species-level identification is very important for patients' diagnosis and treatment. The purpose of this study was to identify mycobacteria species using a high performance liquid chromatography (HPLC) method and to provide an initial database for the distribution of mycobacteria in Korea.

Methods : Acid fast bacteria isolated from 3,107 clinical specimens were identified by mycolic acid analysis using HPLC. The HPLC patterns were compared with those of standard mycobacteria species.

Results : The HPLC patterns were divided into single, double, and triple cluster groups, each group comprising 9, 20, and 4 species, respectively. Mycobacteria and non-tuberculous mycobacteria (NTM) were identified by HPLC at the rates of 99.5% and 95.6%, respectively. NTM was isolated in 12.4% of the mycobacteria positive specimens. This study also found that there were 20 different NTM species with the distribution of each species ranging from 0.3% to 15.9% of the total NTM. While the rate of NTM has been increasing in Korea, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, and *M. chelonae* are relatively decreasing, and *M. kansasii* and *M. goodii* are relatively increasing.

Conclusions : HPLC method was highly discriminative for the identification of NTM in clinical specimens. (*Korean J Lab Med* 2008;28:24-33)

Key Words : *Mycobacterium*, *M. tuberculosis*, Nontuberculous mycobacteria, HPLC

서 론

결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex) 및 비결핵 항산균

(non-tuberculous mycobacteria, NTM)에 의한 감염증의 증가 추세는 전 세계적으로 중요한 관심의 대상이 되고 있다. 후천성면역결핍증의 증가와 면역억제 요법의 일반화에 따라 지난 20년간 결핵균에 의한 감염증은 의미있게 증가하고 있으며[1-4], 최근에는 면역억제 환자뿐만 아니라 정상 면역능을 가진 사람들에서도 결핵균 및 *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. genavence* 등의 NTM의 검출 빈도가 증가하고 있다[5-8]. 또한 NTM은 생활 환경에 널리 분포하고 있어서 임상 검체로부터 분리되어도 병원성

접 수 : 2007년 10월 12일 접수번호 : KJLM2076
수정본접수 : 2007년 10월 23일
게재승인일 : 2007년 11월 7일
교신저자 : 이 선희
우 682-714 울산광역시 동구 전하동 290-3
울산대학교병원 진단검사의학과
전화 : 052-250-7273, Fax : 052-250-8269
E-mail : joseph@uuh.ulsan.kr, 690519@hitel.net

여부를 판단하기 힘들며[9, 10], 일반적으로 결핵균에 유효하다고 알려진 항결핵제들이 NTM에는 효과가 없는 경우가 많고, NTM의 종류에 따라 치료가 다른 경우가 많으므로[11-14], mycobacteria의 균종 감별은 환자의 적절한 치료에 대단히 중요하다. 현재까지 우리나라의 대한결핵협회와 3차 의료기관을 포함한 대부분의 의료기관에서는 mycobacteria의 균종 감별을 위해 전통적인 생화학법이나 중합효소연쇄반응법, 유전자소식자법 등을 많이 사용하고 있으나[4, 15-17], 이 방법들은 동정 시간이 오래 걸리거나, 오염에 의한 위양성률이 높거나, 다양한 NTM을 모두 검출할 수 없거나, 각 균종별로 검사를 시행해야 하는 단점들이 있다[15-21]. 반면, high performance liquid chromatography (HPLC)법은 결핵균 및 다양한 NTM의 균종 특이적 mycolic acid의 분해 산물을 분석하여 동정하는 방법으로 상기의 단점들이 극복된 정확한 방법으로 알려져 있다[22-26]. 또한 우리나라에서의 NTM 감염증의 빈도는 정확히 알려져 있지 않으며, 임상 검체에서 분리되는 mycobacteria의 종별 빈도에 관한 보고도 많지 않다. 이에 본 연구에서는 HPLC법을 이용하여 결핵균 및 다양한 NTM을 동정하여 임상검체에서의 mycobacteria의 균종별 분포를 파악하여 우리나라에서의 결핵균 및 다양한 NTM의 분포에 대한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2002년 1월부터 2006년 12월까지 5년간 울산대학교병원 진단검사의학과에 항산균 배양이 의뢰된 검체 중 초진이거나 최근 6개월간 동일 검체의 항산균 배양 검사에서 음성으로 판정되었던 환자에서 초기 3회의 항산균 배양 검사로 제한하여, 12,821명의 25,044검체들을 검체 종류에 관계없이 모두 항산균 배양의 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 권고안에 따라 고체 배지인 Eiken 3% 오가와 배지(Eiken, Tokyo, Japan)와 액체 배지인 Mycobacteria Growth Indicator Tube (Becton Dickinson, Baltimore, Maryland, USA)에 각각 접종하여 두 배지 중 한 개 이상의 배지에서 항산균 배양 양성으로 확인된 1,342명의 3,107검체를 대상으로 하였다.

2. Mycobacteria의 동정

항산균 배양 양성으로 판정된 경우, mycobacteria의 균종 특이적 mycolic acid를 HPLC법으로 분석하여 얻은 패턴을 표준균주

들의 패턴과 비교 후 동정하여 균종 분포를 조사하였다[22-26]. 표준균주들은 American Type Culture Collection (ATCC) 표준균주 28종과 Korean Type Culture Collection (KTCC) 표준균주 5종, 총 33종을 사용하였다(Table 1).

HPLC 분석에 사용된 구성물로 용제를 분출시키는 펌프와 기화시키는 분사기를 포함하는 본체는 waters 2690 separation module (Waters, Milford, MA, USA)을, 분리를 위한 컬럼은 reverse phase analytical cartridge column, 3.9×75 mm, packed with 3 μ m silica (Nova-Pak C18) 컬럼을, 검출을 위한 자외선 검출기는 photodiode array detector (Waters, Milford, MA, USA)를 이용하였다. 내부 고분자량 및 저분자량 표준물질로는 각각 ρ -bromophenyl ester와 6,7-dimethoxy-4-coumarinylmethyl ester를 사용하였다.

분석 과정은 먼저 methanolic potassium hydroxide를 가하여 mycobacteria 세포를 분해하여 비누화시키고, 클로로포름을 용매로 지방산을 추출하였다. 추출한 성분에 potassium bicarbonate를 가하여 기화시키고, 지방산의 파생물을 정제한 후 컬럼을 통과시켜 자외선 검출기로 HPLC 패턴을 검출하였다. 검출된 HPLC 패턴은 모두 저분자량과 고분자량 표준물질의 peak들 사이에 나타난 특징적인 cluster 패턴을 이용하여 분류하였다. 각 cluster 그룹에 속하는 균주는 각각의 cluster내의 peak 수, peak 유지 시간 및 peak 높이 비율을 기준으로 표준균주들의 HPLC 패턴과 비교하여 최종 동정하고 균종 분포를 조사하였다.

항산균의 HPLC 패턴은 single-cluster 그룹에는 *M. asiaticum*,

Table 1. Standard mycobacterial isolates used in this study

Mycobacterium species	Strain number	Mycobacterium species	Strain number
<i>M. abscessus</i>	ATCC 19977	<i>M. marinum</i>	ATCC 927
<i>M. acapulensis</i>	KTCC 9501	<i>M. mucogenicum</i>	ATCC 49650
<i>M. agri</i>	ATCC 27406	<i>M. nonchromogenicum</i>	ATCC 19530
<i>M. asiaticum</i>	ATCC 25276	<i>M. peregrinum</i>	ATCC 14467
<i>M. austroafricanum</i>	ATCC 33464	<i>M. phlei</i>	ATCC 354
<i>M. avium</i>	ATCC 25291	<i>M. porcinum</i>	KTCC 9517
<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	<i>M. pulveris</i>	KTCC 9518
<i>M. celatum</i>	ATCC 51131	<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981
<i>M. chelonae</i>	ATCC 35752	<i>M. simiae</i>	ATCC 25275
<i>M. diernhoferi</i>	KTCC 9506	<i>M. smegmatis</i>	ATCC 21701
<i>M. flavescens</i>	ATCC 14474	<i>M. szulgai</i>	ATCC 35799
<i>M. fortuitum</i>	ATCC 6841	<i>M. terrae</i>	ATCC 15755
<i>M. gastri</i>	ATCC 15754	<i>M. triviale</i>	ATCC 23292
<i>M. gilvum</i>	KTCC 9512	<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 27294
		H37Rv	
<i>M. gordonae</i>	ATCC 14470	<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	<i>M. xenopi</i>	ATCC 19250
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478		

M. bovis, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. triviale* 및 *M. tuberculosis* complex 등의 9종, double-cluster 그룹에는 *M. abscessus*, *M. acapulensis*, *M. agri*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. diernhoferi*, *M. flavescens*, *M. fortuitum*, *M. gilvum*, *M. intracellulare*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. porcinum*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. terrae* 및 *M. xenopi* 등의 20종, triple-cluster 그룹에는 *M. austroafricanum*, *M. pulveris*, *M. simiae* 및 *M. vaccae* 등의 4종이 각각 포함되었다. 네 개 이상의 peak cluster를 가지는 multi-cluster 그룹은 현재까지 병원성 유무가 확인되지 않은 그룹에 속하여 제외하였다[22]. HPLC 패턴이 표준균주 33종의 어느 것과도 일치하지 않는 경우 unclassified NTM으로 분류하여 균종 분포에 포함시켰다.

결 과

1. HPLC법에 의한 mycobacteria의 동정

Mycobacteria 표준균주 33종과 항산균 배양 양성으로 확인된 1,342명의 3,107검체의 HPLC 검사에서 mycolic acid peak들이 모두 저분자량과 고분자량 표준물질의 peak들 사이에 특징적인 single, double 및 triple-cluster로 나타났다. 3,107검체 중 3,090검체(99.5%)의 HPLC 패턴은 표준균주 33종 중 어느 한 패턴과 일치하여 이 패턴의 표준균주로 동정하였다. 나머지 17검체(0.5%)의 HPLC 패턴은 표준균주들과 일치하는 패턴이 없어 unclassified NTM으로 분류하였다.

*M. tuberculosis*를 제외한 384검체는 19종의 NTM과 unclassified NTM으로 동정되었고, single-cluster 그룹에는 *M. asi-*

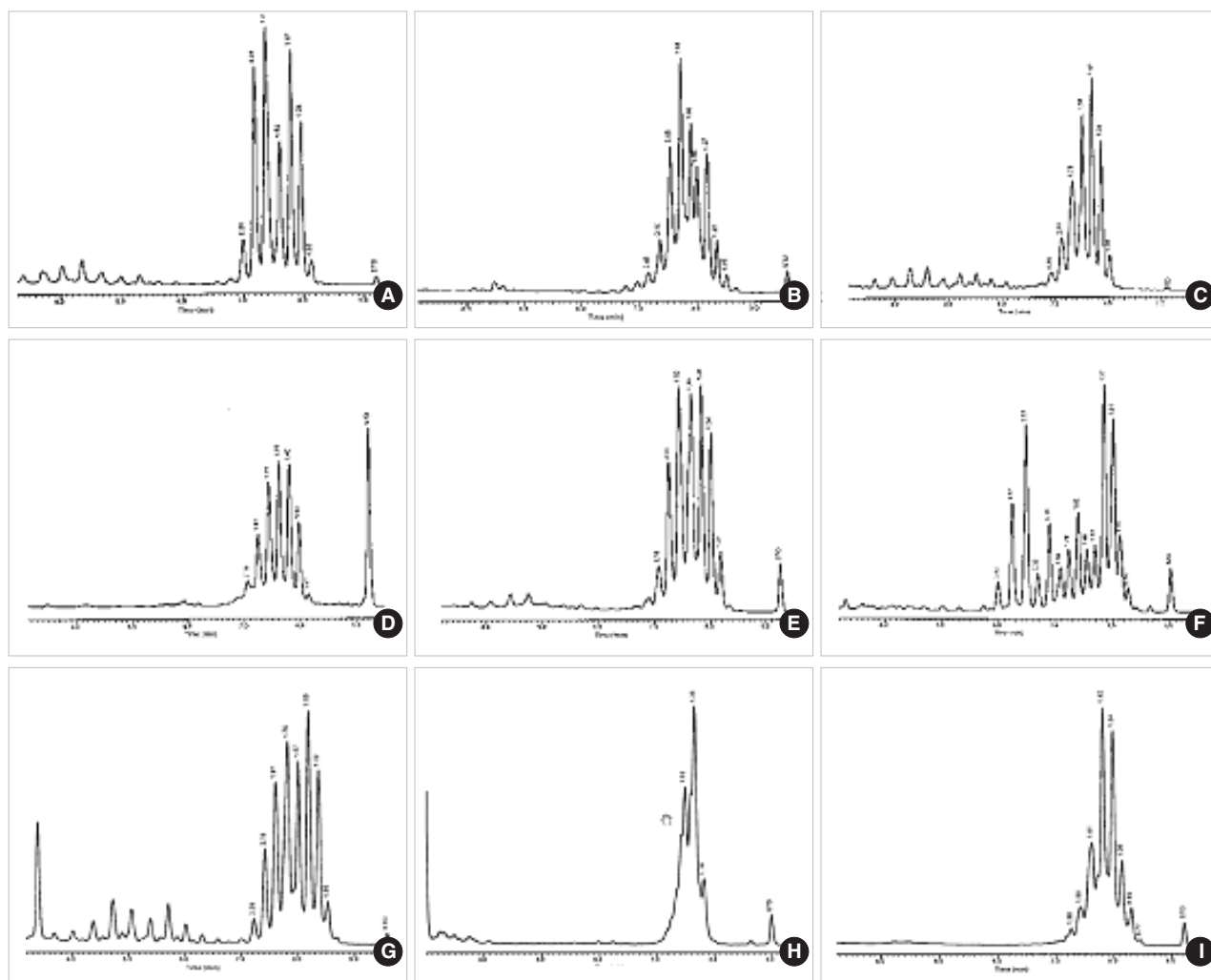


Fig. 1. Characteristic HPLC chromatograms of standard Mycobacterium species with single-cluster peak patterns. (A) *M. asiaticum*. (B) *M. bovis*. (C) *M. gastri*. (D) *M. gordonae*. (E) *M. kansasii*. (F) *M. marinum*. (G) *M. szulgai*. (H) *M. triviale* and (I) *M. tuberculosis*.

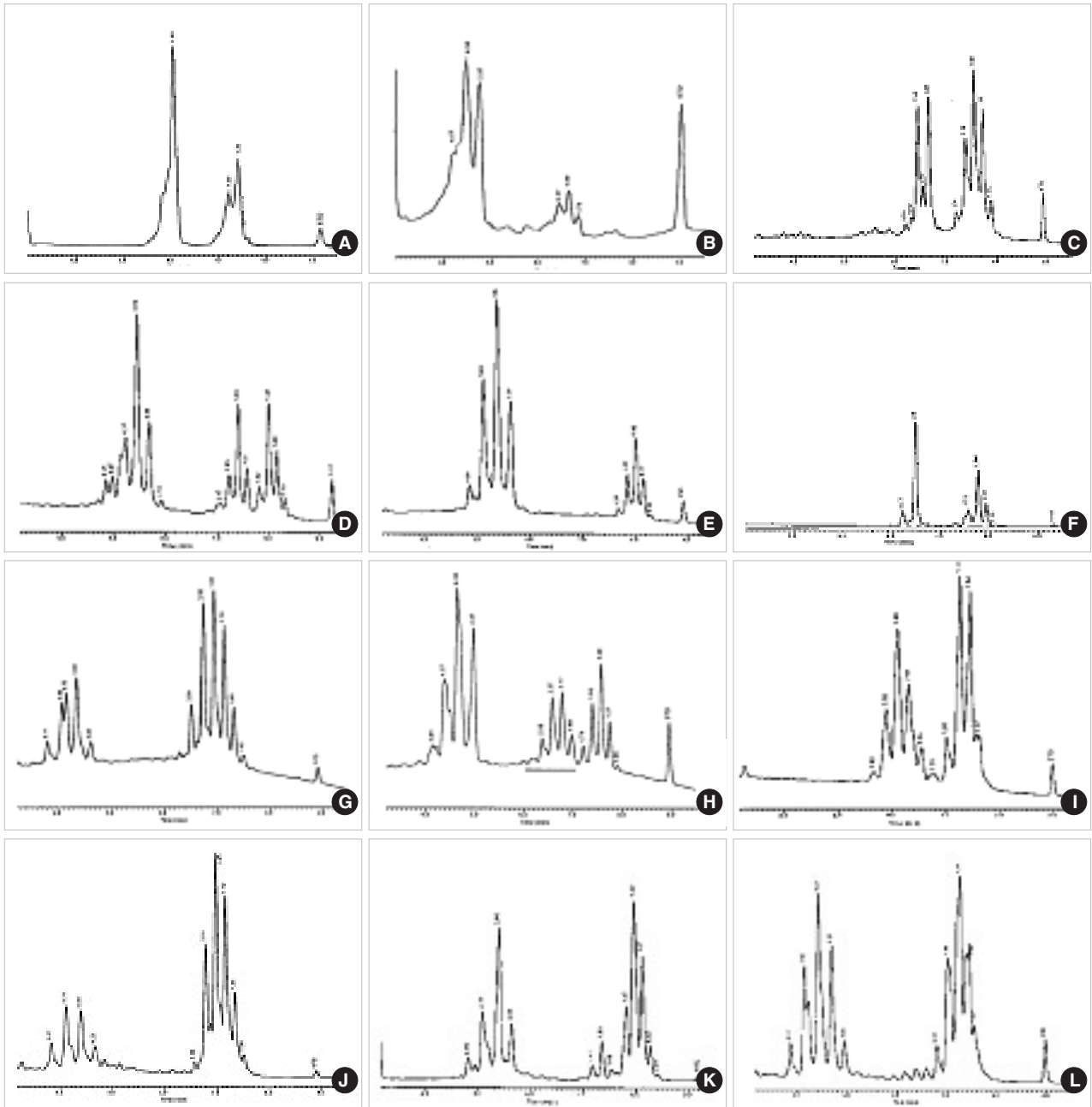


Fig. 2. Characteristic HPLC chromatograms of standard Mycobacterium species with double-cluster peak patterns. (A) *M. abscessus*. (B) *M. acapulensis*. (C) *M. agri*. (D) *M. avium*. (E) *M. celatum*. (F) *M. chelonae*. (G) *M. diernhoferi*. (H) *M. flavescens*. (I) *M. fortuitum*. (J) *M. gilvum*. (K) *M. intracellulare*. (L) *M. mucogenicum*. (Fig. 2 continued next)

aticum, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai* 및 *M. triviale* 등 6종(Fig. 1), double-cluster 그룹에는 *M. abscessus*, *M. acapulensis*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. terrae* 및 *M. xenopi* 등 12종(Fig. 2), triple-cluster 그룹에는 *M. simiae* 1종이 각각 포함되었고(Fig. 3),

multi-cluster 그룹은 검출되지 않았다. 또한 초진이거나 최근 6개월간 동일 검체의 항산균 배양 검사에서 음성으로 판정되었던 환자에서 초기 3회의 항산균 배양 검사로 제한한 본 연구에서는 모든 환자에서 동일한 군주가 검출되었다.

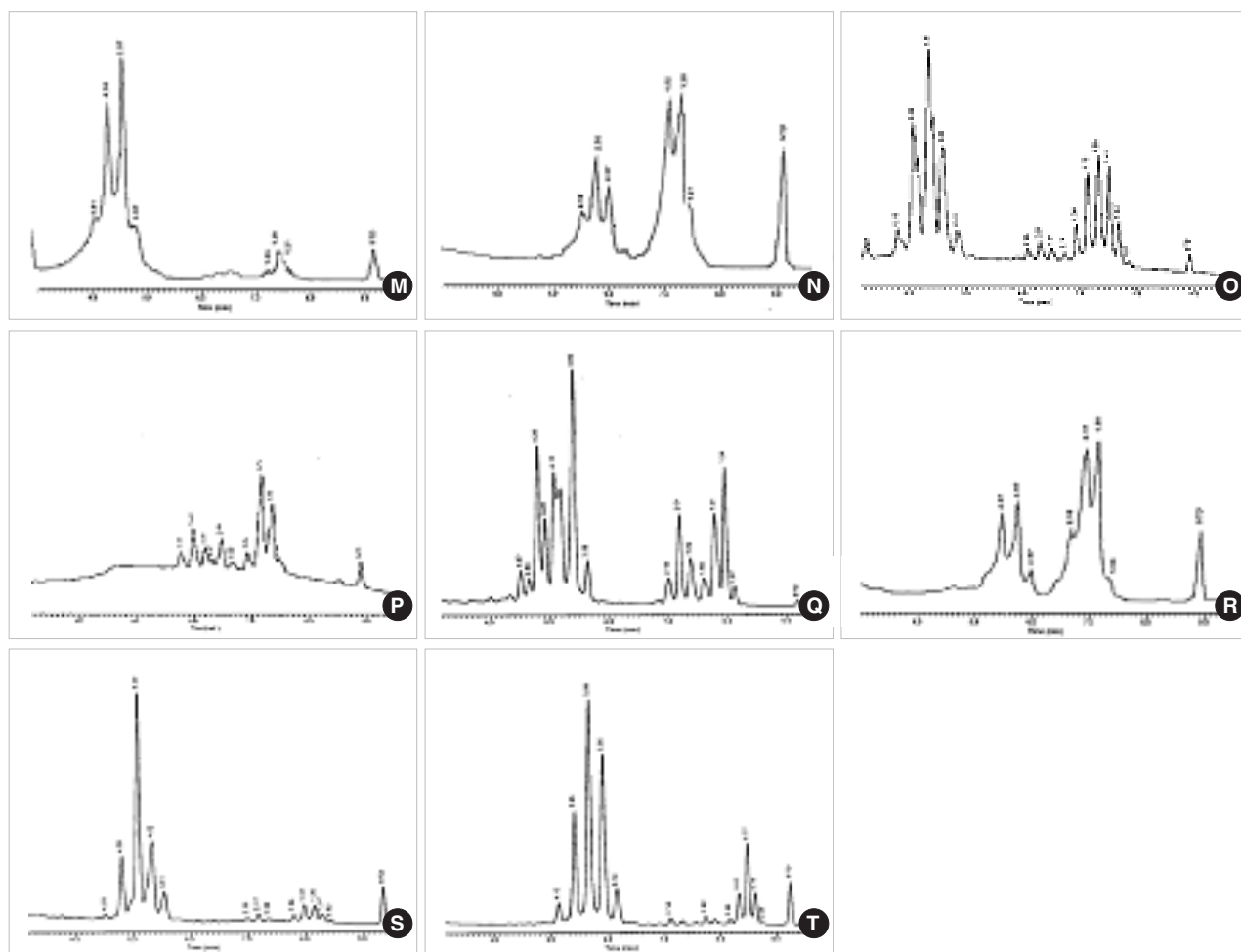


Fig. 2. (Continued from the previous page) (M) *M. nonchromogenicum*. (N) *M. peregrinum*. (O) *M. phlei*. (P) *M. porcinum*. (Q) *M. scrofulaceum*. (R) *M. smegmatis*. (S) *M. terrae* and (T) *M. xenopi*.

2. 임상검체에서 NTM의 균종분포

1,342명의 3,107 검체 중 *M. tuberculosis*는 1,141명(85.0%) 2,723검체(87.6%)였고, NTM은 201명(15.0%) 384검체(12.4%)였다(Table 2). NTM으로 동정된 384검체는 *M. kansasii* 61건(15.9%), *M. intracellulare* 49건(12.8%), *M. gordonae* 44건(11.5%), *M. avium* 38건(9.9%), *M. fortuitum* 34건(8.9%), *M. abscessus* 25건(6.5%), *M. peregrinum* 22건(5.7%), *M. szulgai* 19건(5.0%), *M. marinum* 14건(3.7%), *M. mucogenicum* 14건(3.7%), *M. xenopi* 10건(2.6%), *M. terrae* 8건(2.1%), *M. scrofulaceum* 7건(1.8%), *M. chelonae* 6건(1.6%), *M. triviale* 5건(1.3%), *M. simiae* 4건(1.0%), *M. acapulensis* 3건(0.8%), *M. asiaticum* 3건(0.8%), *M. nonchromogenicum* 1건(0.3%) 및 unclassified NTM 17건(4.4%)의 분포를 보였다(Table 3).

검체별로는 객담 244 (63.5%), 기관지 흡인액 29 (7.6%), 소변

Table 2. Isolation rates of *M. tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria in AFB culture positive specimens using HPLC method

<i>M. tuberculosis</i>		Nontuberculous mycobacteria	
Patients N (%)	Specimens N (%)	Patients N (%)	Specimens N (%)
1,141 (85.0)	2,723 (87.6)	201 (15.0)	384 (12.4)

25 (6.5%), 흉수액 23 (6.0%), 피부조직 22 (5.7%), 림프절 19 (5.0%), 농 9 (2.3%), 뇌척수액 6 (1.6%), 위장관 흡인액 3 (0.8%), 골수 3 (0.8%), 관절액 1 (0.3%)검체 등의 빈도 순으로 검출되었고, 객담, 기관지 흡인액, 흉수액을 포함하는 호흡기계 검체가 296검체(77.1%)였고, 소변, 피부조직, 림프절, 농, 뇌척수액, 위장관 흡인액, 골수, 관절액 등의 비호흡기계 검체가 88검체(22.9%)였다.

5% 이상 검출된 *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*,

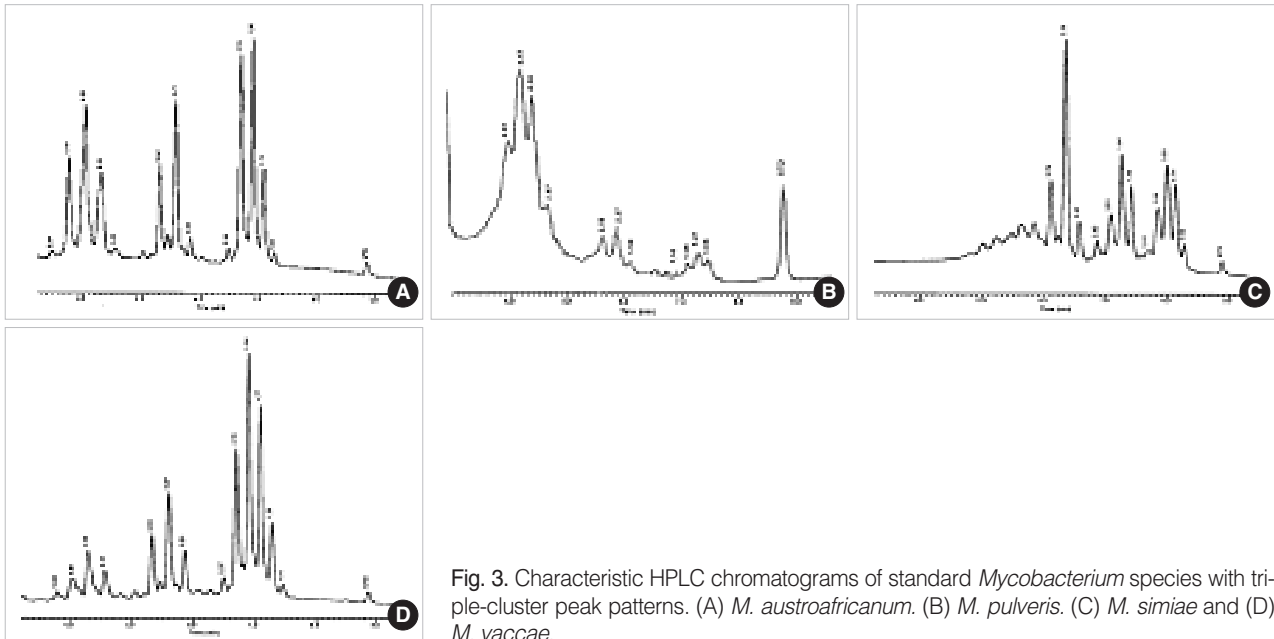


Fig. 3. Characteristic HPLC chromatograms of standard *Mycobacterium* species with triple-cluster peak patterns. (A) *M. austroafricanum*. (B) *M. pulveris*. (C) *M. simiae* and (D) *M. vaccae*.

Table 3. Distribution of nontuberculous *Mycobacterium* species in clinical specimens

Specimen <i>Mycobacterium</i> species	Sputum	BA	Urine	Pleural fluid	Skin tissue	Lymph node	Pus	CSF	GA	BM	JF	Total N (%)
<i>M. kansasii</i> (%)	39 (10.16)	9 (2.34)	0 (0)	5 (1.30)	0 (0)	6 (1.56)	1 (0.26)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	61 (15.89)
<i>M. intracellulare</i> (%)	33 (8.59)	6 (1.56)	0 (0)	2 (0.52)	2 (0.52)	3 (0.78)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	2 (0.21)	0 (0)	49 (12.76)
<i>M. gordonae</i> (%)	21 (5.47)	3 (0.78)	15 (3.91)	2 (0.52)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	1 (0.26)	44 (11.46)
<i>M. avium</i> (%)	25 (6.51)	2 (0.52)	0 (0)	2 (0.52)	2 (0.52)	3 (0.78)	3 (0.78)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	38 (9.90)
<i>M. fortuitum</i> (%)	24 (6.25)	1 (0.26)	2 (0.52)	3 (0.78)	1 (0.26)	1 (0.26)	1 (0.26)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	34 (8.85)
<i>M. abscessus</i> (%)	19 (4.95)	2 (0.52)	0 (0)	2 (0.52)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.52)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	25 (6.51)
<i>M. peregrinum</i> (%)	16 (4.17)	1 (0.26)	2 (0.52)	1 (0.26)	0 (0)	2 (0.52)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	22 (5.73)
<i>M. szulgai</i> (%)	14 (3.65)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.26)	2 (0.52)	2 (0.52)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	19 (4.95)
<i>M. marinum</i> (%)	4 (1.04)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (2.08)	0 (0)	2 (0.52)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (3.65)
<i>M. mucogenicum</i> (%)	9 (2.34)	1 (0.26)	2 (0.52)	1 (0.26)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (3.65)
<i>M. xenopi</i> (%)	2 (0.56)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (2.08)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (2.60)
<i>M. terrae</i> (%)	6 (1.56)	1 (0.26)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (2.08)
<i>M. scrofulaceum</i> (%)	5 (1.30)	1 (0.26)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (1.82)
<i>M. chelonae</i> (%)	4 (1.04)	1 (0.26)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (1.56)
<i>M. triviale</i> (%)	4 (1.04)	0 (0)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (1.30)
<i>M. simiae</i> (%)	3 (0.78)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (1.04)
<i>M. acapulensis</i> (%)	2 (0.52)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0.78)
<i>M. asiaticum</i> (%)	2 (0.52)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0.78)
<i>M. nonchromogenicum</i> (%)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.26)
unclassified NTM (%)	11 (2.86)	1 (0.26)	1 (0.26)	1 (0.26)	1 (0.26)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	1 (0.26)	0 (0)	0 (0)	17 (4.43)
Total	244 (63.54)	29 (7.55)	25 (6.51)	23 (5.99)	22 (5.73)	19 (4.95)	9 (2.34)	6 (1.56)	3 (0.78)	3 (0.78)	1 (0.26)	384 (100)

Abbreviations: BA, Bronchial aspirates; CSF, Cerebrospinal fluid; GA, Gastric aspirates; BM, Bone marrow; JF, Joint fluid.

M. avium, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. peregrinum* 및 *M. szulgai*를 1년 단위로 분석했을 때 각 균종별 검출률은 차이가 없었다 (Table 4).

고 찰

임상 검체에서 결핵균의 동정은 결핵균 감염증을 진단하기 위한 최선의 방법이며, 최근 후천성면역결핍증의 증가와 면역억제 요법의 일반화에 따라 의미있게 증가하고 있는 NTM의 동정도 매우 중

Table 4. Annual incidence of species comprising more than 5% of total nontuberculous mycobacteria

Years	2002	2003	2004	2005	2006	Total
<i>Mycobacterium</i> species	N	N	N	N	N	N
<i>M. kansasii</i>	12	12	14	11	12	61
<i>M. intracellulare</i>	9	10	9	9	12	49
<i>M. gordonae</i>	10	9	7	10	8	44
<i>M. avium</i>	7	8	8	9	7	38
<i>M. fortuitum</i>	6	6	8	7	7	34
<i>M. abscessus</i>	5	4	5	5	6	25
<i>M. peregrinum</i>	3	5	4	4	6	22
<i>M. szulgai</i>	5	4	2	4	4	19
Total	57	58	57	59	62	293

요하다[10-12]. NTM은 현재까지 91종 이상이 알려져 있으며 [27], 물, 토양, 공기 및 환자 등에서 검출된 NTM 중 현재까지 알려진 균종에 포함되지 않는 경우가 30%에 이른다고 알려져 있다[28].

임상 검체에서 NTM이 검출될 경우 기회 감염균으로 알려져 있으나, 최근 후천성면역결핍증의 증가와 면역억제 요법의 일반화에 따라 NTM 감염증도 의미있게 증가하고 있으며[10, 11, 29, 30], 면역억제 환자뿐만 아니라 정상 면역능을 가진 사람들에서도 NTM의 검출 빈도가 증가하고 있다[5-8, 31-33]. 동시에 NTM 감염증은 결핵과는 달리 개발도상국과 선진국 모두에서 증가 추세이다 [30].

그러나 현재까지 mycobacteria의 균종 분포를 확인하기 위한 검출 방법으로 널리 이용되고 있는 전통적인 생화학법은 민감도가 낮거나 검출에 오랜 시간이 걸리고, 균종 단계까지 동정하기 어렵다. 또한 mycobacteria의 균종 감별에 빠르고 정확하다고 알려진 중합효소연쇄반응법, 유전자소식자법등을 많이 사용하고 있으나, 이 방법들은 오염에 의한 위양성률이 높거나, 다양한 NTM을 모두 검출할 수 없거나, 각 균종별로 검사를 시행해야 하는 단점들이 있다 [15-21, 34]. 반면, HPLC를 이용한 mycobacteria 동정법은 균종 특이적 mycolic acid를 분석하여 얻은 HPLC 패턴을 표준균주들의 HPLC 패턴과 대조하여 동정하는 방법으로 상기의 단점들이 극복된 정확한 방법으로 알려져 있다[22-26].

본 연구에서는 mycobacteria의 균종 분포를 확인하기 위해 33종의 mycobacteria 표준균주를 이용한 HPLC법으로 동정하였는데, 3,107검체 중 17검체를 제외한 3,090검체의 HPLC 패턴이 표준균주 33종 중 어느 한 패턴과 일치하여 99.5%, *M. tuberculosis*를 제외한 NTM의 경우만으로 제한하면 384검체 중 367검체(95.6%)에서 동정이 가능하여 우수한 변별력을 확인할 수 있으며, 본 연구에서는 unclassified NTM을 포함하여 총 20종으로

동정되었고, multi-cluster 그룹은 검출되지 않았다.

1960년대 NTM의 국내 빈도[35, 36]는 배양 양성 검체 중 1% 미만으로, 1970년 김 등[37]은 객담에서 NTM이 2.7%로 보고하였는데, 본 연구에서는 NTM이 384건(201명)으로 배양 양성 검체의 12.4%, 환자의 15.0%로 나타나 70년대 이후 국내에서도 NTM의 검출률이 대단히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

또한 임상 검체에서 분리되는 NTM의 종별 빈도와 균종 분포에 관한 보고도 많지 않은데, 1995년 대한결핵 및 호흡기학회에서 조사한 NTM 전국 실태조사[4]에서는 1981년부터 1994년까지 14년간 대한결핵협회 결핵연구원에 의뢰된 검체 중 총 158검체에서 159건의 NTM을 전통적인 생화학적 방법으로 동정하였다. 이 조사에서 NTM의 균주 분포는 *M. avium-intracellulare* 104건(65.2%), *M. fortuitum* 20건(12.7%), *M. chelonae* 15건(9.5%), *M. gordonae* 7건(4.4%), *M. terrae* 5건(3.2%), *M. scrofulaceum* 3건(1.9%), *M. kansasii* 2건(1.3%), *M. szulgai* 2건(1.3%), *M. avium-intracellulare* & *terrae* 1건(0.6%)였다. 이에 반해 본 연구에서는 2002년부터 2006년까지 5년간 울산 지역에서 검출된 NTM이 384건으로 1981년부터 14년간 전국적으로 검출한 159건보다 2.5배 정도로 많았으며, 균종별 빈도는 1995년 대한결핵 및 호흡기학회에서 조사한 NTM 전국 실태조사[4]의 검출된 균종은 총 9종임에 반해 본 연구의 임상 검체에서 검출된 NTM의 종류는 총 20종으로 증가하였는데, 이는 동정에 HPLC법을 이용하여 보다 다양한 NTM이 동정되었고, NTM 감염증이 증가 추세에 있는 두 가지 이유 때문으로 판단된다. 그러나 본 연구에서 5% 이상 검출된 *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. peregrinum* 및 *M. szulgai*를 1년 단위로 분석했을 때 각 균종별 검출률은 차이가 없었기 때문에 검출된 균종의 증가는 NTM 감염증의 증가보다는 HPLC법을 이용한 동정으로 보다 다양한 NTM이 검출된 때문으로 판단된다.

또한 본 연구의 균종 분포에서는 *M. avium*과 *M. intracellulare*를 포함하는 *M. avium* complex의 경우 검출 빈도는 22.7%로 가장 높지만 1995년 대한결핵 및 호흡기학회에서 조사한 NTM 전국 실태조사[4]에서의 65.2%에 비해 상대적으로 감소하였고, *M. fortuitum*과 *M. chelonae* 등의 경우에도 본 연구에서의 빈도는 각각 8.9%, 1.6%로 1995년 대한결핵 및 호흡기학회에서 조사한 NTM 전국 실태조사[4]의 12.7%, 9.5%에 비해 상대적으로 감소하였다. 반면 1995년 NTM 전국 실태조사[4]와 비교해 *M. kansasii*는 1.3%에서 15.9%로, *M. gordonae*는 4.4%에서 11.5%로, *M. abscessus*는 0%에서 6.5%로, *M. peregrinum*은 0%에서 5.7%로, *M. szulgai*는 1.3%에서 5.0%로, *M. marinum*과 *M.*

*mucogenicum*은 0%에서 3.7%로, *M. xenopi*는 0%에서 2.6%로 증가하였는데, 이 증감 추세는 미국의 질병관리센터에서 1993년부터 1996년까지 조사한 NTM 증감 추세[38]와 유사하며, 이는 보다 발전된 정확한 검출법으로 다양한 NTM이 동정되고, 전 세계적으로 NTM 감염증이 증가 추세에 있기 때문인 것으로 판단된다. 또한 2006년 고 등[39]은 NTM 폐질환자의 원인균은 *M. avium complex* (48%)와 *M. abscessus* (33%)가 가장 많다고 한 결과와 비교하면, 본 연구에서는 *M. kansasii* 증가가 특징적인데, 이는 본 연구에서 호흡기 및 비호흡기의 모든 검체를 대상으로 검사하였고, NTM의 지역적인 분포 특성 등이 원인으로 판단된다[40].

본 연구에서의 NTM의 검체별 빈도는 객담, 기관지 흡인액, 흉수액을 포함하는 호흡기계 검체에서 296검체(77.1%)가 검출되어 NTM도 결핵과 같이 호흡기계에서 가장 많이 검출되었고, 비호흡기계에서는 소변, 피부조직, 림프절, 농, 뇌척수액, 위장관 흡인액, 골수, 관절액 등의 다양한 검체에서 검출되었다.

결론적으로 HPLC법에 의하여 임상검체에서 배양된 항산균의 99.5% 및 NTM 균주의 95.6%를 동정할 수 있었으며, 20종의 NTM이 배양 항산균의 12.4%를 차지하였다. NTM의 중별 빈도에서는 *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* 등은 상대적 감소를, *M. kansasii*, *M. gordonae* 등은 상대적 증가 추세를 보였다. 그러므로 NTM 감염증의 적절한 진단과 치료를 위해서는 임상 검체에서 NTM을 검출하기 위해 변별력이 뛰어난 검출법을 이용하여야 할 것으로 생각되며, NTM이 검출될 경우 본 연구의 균종 분포를 진단과 치료에 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

배경 : 결핵균 및 비결핵 항산균(non-tuberculous mycobacteria, NTM)은 의미있게 증가하고 있으며, NTM의 경우 병원성 여부를 판단하기 힘들고, 효과적인 치료가 어렵기 때문에 mycobacteria의 균종 감별은 대단히 중요하다. 본 연구에서는 HPLC법을 이용하여 결핵균 및 다양한 NTM을 동정하여 임상검체에서의 mycobacteria의 균종별 분포를 파악하여, 우리나라에서의 결핵균 및 다양한 NTM의 분포에 대한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

방법 : 항산균 배양 검사에서 양성으로 확인된 3,107검체를 대상으로 mycobacteria의 균종 특이적 mycolic acid를 HPLC법으로 분석하여 얻은 패턴을 표준균주들의 패턴과 비교 후 동정하여 균종 분포를 조사하였다.

결과 : HPLC 패턴은 single, double 및 triple-cluster 양상을

보였고 각각 9, 20, 4종이 포함되었다. HPLC법으로 mycobacteria 동정 성공률은 99.5%, *M. tuberculosis*를 제외한 NTM의 경우 95.6%였다. 항산균 배양 양성 검체 중 NTM의 비율은 12.4%였고, 총 20종의 NTM은 0.3-15.9%까지의 분포를 보였다.

결론 : HPLC법은 결핵균 및 NTM 동정에 우수한 변별력을 보였고, 우리나라에서도 NTM의 검출률이 대단히 증가한 것을 확인하였다. NTM의 경우 *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* 등은 상대적 감소를, *M. kansasii*, *M. gordonae* 등은 상대적 증가 추세를 보였다.

참고문헌

1. Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995;273:220-6.
2. World Health Organization. Strategic framework to decrease the burden of TB/HIV. WHO/CDS/TB/2002.296, WHO/HIV_AIDS/02.2. 2002.
3. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/TB/2002.295. 2002.
4. Korean academy of tuberculosis and respiratory disease. National survey of mycobacterial disease other than tuberculosis in Korea. Tuberc Respir Dis 1995;42:277-94. (대한결핵 및 호흡기학회. 비결핵 항산균증 전국 실태조사. 결핵 및 호흡기질환 1995;42:277-94.)
5. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996;9:177-215.
6. Horsburgh CR Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1991;324:1332-8.
7. Hoffner SE. Pulmonary infections caused by less frequently encountered slow-growing environmental mycobacteria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994;13:937-41.
8. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, Gottlieb JE, Scott R, Israel HL, et al. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. N Engl J Med 1989;321:863-8.
9. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis 1979;119:107-59.
10. Mori T. Atypical mycobacteriosis. Nippon Rinsho 2001;59(S):S197-204.
11. Holdiness MR. Atypical mycobacterial infections. J La State Med Soc 1990;142:31-8.
12. Kruger M. Atypical mycobacterium infections. Derm Beruf Umwelt

- 1990;38:109-17.
13. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. Am J Respir Crit Care Med 1997;156: S1-25.
 14. Phillips MS and von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. Clin Infect Dis 2001;33:1363-74.
 15. Park CM, Heo SR, Park KU, Song JH, Lee JH, Lee CT, et al. Isolation of Nontuberculous mycobacteria using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Korean J Lab Med 2006; 26:161-7. (박철민, 허세란, 박경은, 송정환, 이재호, 이춘택 등. 중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성을 이용한 비결핵항산균의 분리. 대한진단검사의학회지 2006;26:161-7.)
 16. Nah J, Huh JW, Lee SH, Kim BC, Koh YS, Pai CH. Identification of mycobacterium tuberculosis complex using a gene probe method. Korean J Clin Pathol 1997;17:71-8. (나준, 허정원, 이성희, 김봉철, 고윤석, 배직현. Gene Probe 법에 의한 Mycobacterium tuberculosis complex의 동정. 대한임상병리학회지 1997;17:71-8.)
 17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Molecular diagnostic methods for infectious diseases. Proposed guideline, 2nd ed. MM3-P2. Wayne, Pa: NCCLS, 2005.
 18. Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of Mycobacterium tuberculosis. N Engl J Med 1993;329:2036.
 19. Leao SC, Sampaio JL, Martin A, Palomino JC, Portaels F. Profiling *Mycobacterium ulcerans* with hsp65. Emerg Infect Dis 2005;11:1795-6
 20. Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium goodii* directly from BACTEC TB broth cultures. J Clin Microbiol 1994;32:2995-8.
 21. Burman WJ and Reves RR. Review of false positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. Clin Infect Dis 2000;31:1390-5.
 22. Butler WR and Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. Clin Microbiol Rev 2001;14:704-26.
 23. Butler WR, Jost KC Jr, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. J Clin Microbiol 1991;29: 2468-72.
 24. Butler WR, Floyd MM, et al. eds. Mycolic acid pattern standards for HPLC identification of mycobacteria. Atlanta, Ga: Centers for Disease Control and Prevention, US department of health and human services 1999:1-86.25. Butler WR, Floyd MM, et al. eds. Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. Atlanta, Ga: US department of health and human services 1996:1-99.
 26. Jeong J, Lee SH, Jeong US, Chang CH, Kim SR. Identification of mycobacteria using high performance liquid chromatography in clinical specimens. Korean J Clin Microbiol 2004;7:148-55. (정윤성, 이선호, 정의석, 장철훈, 김성률. 임상검체에서 High performance liquid chromatography법을 이용한 mycobacteria의 동정. 대한임상미생물학회지 2004;7:148-55.)
 27. Euzéby JP ed. List of bacterial names with standing in nomenclature, 1998. Society for Systematic and Veterinary Bacteriology, London. 2002.
 28. Tortoli E, Bartoloni A, Bottger EC, Emler S, Garzelli C, Magliano E, et al. Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. J Clin Microbiol 2001;39:4058-65.
 29. Field SK and Cowie RL. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. Chest 2006;129:1653-72.
 30. Olivier KN. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. Curr Opin Pulm Med 1998;4:148-53.
 31. Dobos KM, Quinn FD, Ashford DA, Horsburgh CR, King CH. Emergence of a unique group of necrotizing mycobacterial diseases. Emerg Infect Dis 1999;5:367-78.
 32. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev 1993;6:266-310.
 33. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2004;17:98-106.
 34. O'Brien RJ, Geiter LJ, Snider DE Jr. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. Am Rev Respir Dis 1987;135:1007-14.
 35. Kim KS, Shin YD, Ahn JW, Lee SK. Unclassified mycobacteria in Korea epidemiological study on unclassified infection using purified tuberculin protein. Tuberc Respir Dis 1966;13:5-20. (김경수, 신용달, 안재원, 이성관. Unclassified mycobacteria의 역학적 연구. 결핵 및 호흡기질환 1966;13:5-20.)
 36. Lee SK and Shin YD. Epidemiologic study on the unclassified mycobacteria in Korea. Tuberc Respir Dis 1967;14:12-38. (이성관 및 신용달. 비결핵항산균 감염의 역학적 연구. 결핵 및 호흡기질환 1967;14: 12-38.)
 37. Kim SC and Kim SC. A study on unclassified mycobacteria isolated

- from human sputa. Tuberc Respir Dis 1970;17:33-42. (김성진 및 김상재. 객담에서 분리된 미분류항산균에 관한 연구. 결핵 및 호흡기 질환 1970;17:33-42.)
38. Centers for Disease Control and Prevention. Nontuberculous mycobacteria reported to the public health laboratory information system by state public health laboratories United States, 1993-1996. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1999.
39. Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K, Kim TS, Lee KS, Park YK, et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. Chest 2006;129:341-8.
40. Yim JJ, Park YK, Lew WJ, Bai GH, Han SK, Shim YS. *Mycobacterium kansasii* pulmonary diseases in Korea. J Korean Med Sci 2005;20:957-60.