

1)

다중 중합효소연쇄반응 및 제한효소 RFLP를 이용한 마이코박테리아의 동정

가천의과대학 길병원 임상병리과, 의료법인 휴먼텍*, 성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 임상병리과†

서일해 · 김 완 · 안정열* · 금동극†

Identification of *Mycobacterium* Species by Multiplex PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay

Yiel Hea Seo, M.D., Wan Kim, M.D., Jung Yeal Ann, M.D.* and Dong Geuk Keum, M.D.†

Department of Clinical Pathology, Gachon Medical College Gil Medical Center, Incheon,
Humantech*, Department of Clinical Pathology, Kangbuk Samsung Hospital, College of Medicine,
Sungkyunkwan University†, Seoul, Korea

Background : Recently the clinical significance of several mycobacterial species has been increased and there is a growing need to identify mycobacteria to the species level. We evaluated multiplex polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay for identification of mycobacterial isolates.

Methods : Reference strains of 6 species of mycobacteria and 88 clinical isolates were lysed by boiling method. The lysates were used for multiplex PCR reactions incorporating three pairs of PCR primers, which were expected to amplify fragments from the 65-kDa gene common to all mycobacteria, genes of *M. tuberculosis* complex and *M. avium*, respectively. The resultant amplicons were digested with the restric-

tion enzymes *PspEI* and *HaeIII*. Multiplex PCR products and digested products were visualized by electrophoresis on agarose gels.

Results : Six reference strains yielded compatible results. Eighty-eight clinical isolates were identified as *M. tuberculosis* complex (81 strains), *M. avium* (2 strains), *M. intracellulare* (2 strains), *M. fortuitum* biovariant *peregrinum* (2 strains), and *M. gordonae* III (1 strain).

Conclusion : Multiplex PCR-RFLP assay appears to be a reliable method for rapid identification of mycobacteria to species level (Korean J Infect Dis 31:148~152, 1999).

Key Words : Mycobacteria, 65-kDa gene, Multiplex PCR, RFLP

서 론

Genus *Mycobacterium*에는 약 70여 종(species)이 존재하며, 과거에는 *M. tuberculosis* complex 와 *M. leprae*가 주로 인체에 감염을 일으키고, 그 이외의 비결핵성 마이코박테리아(nontuberculous mycobacteria, NTM)는 대부분 비병원성으로 간주되어 왔다¹⁾. 그러나 AIDS, 종양, 이식 등으로 면역력이 저하된 환자들이 증가하면서 비결핵성 마이코박테리아

에 의한 인체감염이 문제되기 시작하였으며 최근까지 지속적인 증가추세에 있다^{2, 3)}. 또한 마이코박테리아는 각 종에 따라 인체에 대한 감염력이 다르며, 치료약제에 대한 반응도 다르므로 정확한 마이코박테리아의 동정은 임상적으로 매우 중요한 의미를 갖는다^{4, 5)}.

통상적인 마이코박테리아의 동정은 배양균의 성장속도, 색소생성 유무 및 생화학적 성상 등에 의해 이루어지는데 이는 많은 시간과 노력이 요구되므로, 현재 우리 나라 대부분의 검사실에서는 *M. tuberculosis*와 그 이외의 비결핵성 마이코박테리아 정도로만 분리동정이 이루어지고 있다. 따라서 좀 더 빠르고, 쉽게 이용할 수 있는 동정법들이 개발되고 있는

접수: 1999년 2월 15일, 승인: 1999년 4월 3일
교신저자: 서일해. 가천의과대학 길병원 임상병리과
Tel: 032)460-3074, Fax: 032)460-3415

데, HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용한 mycolic fatty acid 분석법은 통상적인 방법에 비해 빠르고 정확하지만, 특수장비 및 전문가가 구비되어야 하므로 보편적으로 이용하기는 어렵다⁶⁾. DNA 혹은 RNA 탐식자를 이용한 동정법은 상품화된 키트(kit)가 있어서 쉽게 이용할 수 있는 반면 방사성 동위원소를 사용해야 하고 개발된 탐식자의 종류가 많지 않아서 제한된 종의 동정만이 가능하다^{7, 8)}. 최근에는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자나 65-kDa 유전자의 염기서열이 밝혀짐에 따라, 이러한 유전자를 이용하여 마이코박테리아를 동정하는 방법들이 보고되고 있다⁹⁻¹³⁾.

본 연구에서는 다중 중합효소연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction) 및 제한효소 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 이용하여 마이코박테리아를 동정해 보고자 하였다. 각 마이코박테리아에 공통적으로 존재하는 65-kDa 유전자에 대한 시발체(primer)와 *M. tuberculosis*, *M. avium* 유전자에 각각 특이적인 시발체를 이용해 다중 중합효소연쇄반응을 시행한 다음, 각 반응산물을 제한효소 *PspEI*, *HaeIII*로 처리하여 RFLP 양상을 관찰함으로써 각 마이코박테리아를 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

표준균주는 대한결핵연구원에서 분양받은 6균주로 *M. tuberculosis* H37Rv(ATCC 27294), *M. avium*(ATCC25291), *M. intracellulare*(ATCC 13950), *M. kansasii*(ATCC12478), *M. fortuitum*(ATCC 6841), *M. szulgai*(ATCC 35799)를 이용하였다.

임상 분리균주는 1998년 1월부터 1998년 4월까지 가천의대 부속 길병원에서 시행된 결핵균 배양검사서에서 분리된 88균주(객담 80균주, 흉막강액 3균주, 기관지 세척액 2균주, 뇌척수액 2균주, 임파절 1균주)를 대상으로 하였다. 3개월 이내에 동일한 환자로부터 분리된 경우에는 동일한 균주로 취급하였다.

2. 방 법

1) DNA 추출

Ogawa배지에서 자란 균 집락을 백금으로 취하여 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA[pH 8.0]) 200 μ L에 넣어 부유시켰다. 이 부유물을 20분 동안 중탕한 후, 13,000 rpm (Ependorf centrifuge 5415C, Germany)에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다.

2) 다중 중합효소연쇄반응

시발체는 Cormican 등¹¹⁾의 방법에 준하여 주문 합성하였다(Bioneer, Korea). Tb11(5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3')과 Tb12(5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3')는 각 마이코박테리아에 공통적으로 존재하는 65-kDa 유전자 부위에, MPB64-1(5'-TCCGCTGCCAGTCGGCTTCC-3')과 MPB64-2(5'-GTCCTCGCGAGTCTAGGCCA-3')는 *M. tuberculosis* complex 유전자에, MYCGEN-F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 MYCAV-R(5'-ACCAGAAGACATGCGCTCTTG-3')는 *M. avium* 유전자에 특이적으로 반응하는 시발체로서 중합효소연쇄반응의 생성물 크기는 각각 439 bp, 240 bp, 180 bp가 되도록 고안하였다.

반응액은 dNTP(Promega, USA) 각각 200 μ M, 시발체 Tb11, Tb12 각각 0.5 μ M, MPB64-1, MPB64-2 각각 0.2 μ M, MYCGEN-F, MYCAV-R 각각 0.45 μ M, 1.5 mM $MgCl_2$, 반응 완충액 5 μ L, Taq polymerase(Promega, USA) 0.5 U, 분리한 DNA용액 5 μ L에 적당량의 증류수를 가하여 전체 50 μ L용액으로 만든 후 중합효소연쇄반응을 시행하였다.

반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초회 denaturation 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 과정을 35회 반복하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension시켰다. 반응산물은 2.5% NuSieve agarose gel(FMC Bioproducts, USA)에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 polaroid 667 film으로 촬영하여 관찰하였다.

3) 제한효소 RFLP

중합효소연쇄반응 산물 중 10 μ L를 취해 제한효소 *PspEI*, *HaeIII*(Bioneer, Korea)로 처리하였다. 반응액은 중합효소연쇄반응 산물 10 μ L, 제한효소 5 U, 반응 완충액 2.5 μ L에 적당량의 증류수를 가하여 전체 25 μ L용액으로 만든 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 제한효소처리 후의 산물은 2.5% NuSieve agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 polaroid 667 film으로 촬영하여 관찰하였다.

결 과

1. 표준균주

다중 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 *M. tuberculosis* H37Rv는 439 bp와 240 bp 위치에 band가 관찰되었으며, *M. avium*은 439 bp와 180 bp 위치에 band가 관찰되었다. 그 이외의 표준균주 *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M.*

fortuitum, *M. szulgai*는 모두 439 bp 위치에 한 개의 band만이 관찰되었다(Figure 1).

제한효소 *PspEI*, *HaeIII*로 처리한 결과는 각 균주별로 뚜렷한 소견을 보였으며, primer-dimer와의 혼동을 피하기 위하여 60 bp 미만의 band는 무시하였다(Figure 2).

2. 임상 분리균주

다중 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 전체 88 균주 중

*M. tuberculosis*가 81균주(92%), *M. avium*이 2균주, 그리고 그 이외의 비결핵성 마이코박테리아가 5균주로 동정되었다.

비결핵성 마이코박테리아로 동정된 5균주는 제한효소로 처리한 결과 *M. intracellulare*가 2균주, *M. fortuitum* biovariant *peregrinum*이 2균주, *M. gordonae* III가 1균주로 동정되었다.

고 찰

비결핵성 마이코박테리아에 의한 인체감염이 증가하면서 마이코박테리아의 동정에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있으며, 최근에는 마이코박테리아의 유전자 구조가 밝혀지면서 이들을 이용한 동정법들이 개발되어 보고되고 있다⁹⁻¹⁷⁾. 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자나 65-kDa 유전자는 모든 마이코박테리아에 공통적으로 존재하지만 각 종에 따라 약간의 차이가 있는 염기서열을 가지고 있는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 따라서 각 종에 따른 유전자 구조의 다양성에 근거하여 염기서열 분석이라든지, 중합효소연쇄반응, 혹은 제한효소에 의한 RFLP법 등으로 종 수준에서의 마이코박테리아를 동정할 수 있다.

Cormican 등¹¹⁾은 65-kDa 유전자를 이용하여 마이코박테리아를 동정하는 방법을 보고하였다. 그 방법을 간략하게 설명하면 먼저 세쌍의 시발체를 이용해 다중 중합효소연쇄반응을 시행하여 *M. tuberculosis*, *M. avium*, 그리고 그 이외의 비결핵성 마이코박테리아로 구분한 다음, 반응산물을 제한효

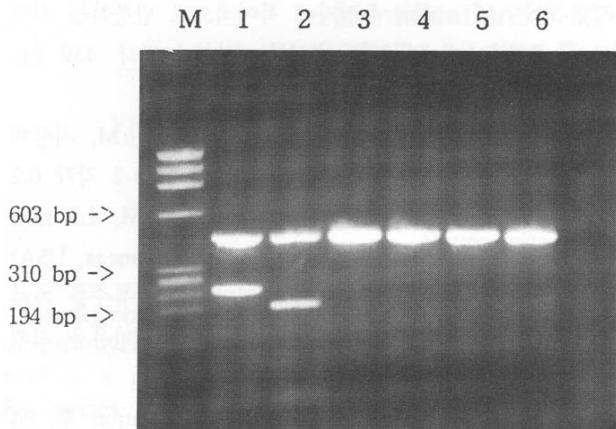


Figure 1. Results of multiplex PCR products (on ethidium bromide stained 2.5% NuSieve agarose gel) from the following 6 reference strains. Lanes: M, molecular size marker (*HaeIII*-digested Phi-X174 DNA); 1, *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294); 2, *M. avium* (ATCC25291); 3, *M. intracellulare* (ATCC13950); 4, *M. kansasii* (ATCC12478); 5, *M. fortuitum* (ATCC6841); 6, *M. szulgai* (ATCC35799).

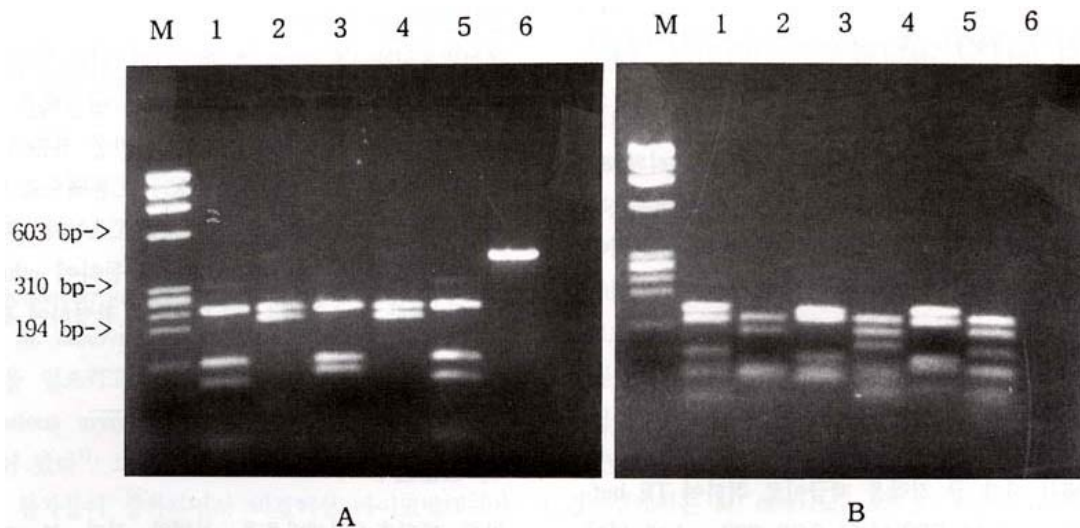


Figure 2. RFLP profiles of the 439 bp amplicon. RFLP patterns were generated by digestion with *PspEI* (A), *HaeIII* (B) of the amplicons from the following 6 reference strains. Lanes: M, molecular size marker (*HaeIII*-digested Phi-X174 DNA); 1, *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294); 2, *M. avium* (ATCC25291); 3, *M. intracellulare* (ATCC13950); 4, *M. kansasii* (ATCC12478); 5, *M. fortuitum* (ATCC6841); 6, *M. szulgai* (ATCC35799).

소로 처리하여 나머지 비결핵성 마이코박테리아를 동정하는 방법이다. 마이코박테리아 중에서 인체감염을 유발하는 것으로는 *M. tuberculosis*와 *M. avium* complex가 대부분인 것으로 알려져 있는바, 이 방법은 다중 중합효소연쇄반응만으로 분리된 균의 대부분을 동정할 수 있으며, 그 이외의 나머지 균에 대해서만 제한효소를 처리해도 되므로 비교적 빠르고 쉽게 이용할 수 있을 것으로 생각된다^{4, 5, 19}.

본 연구에서도 Cormican 등¹¹⁾의 방법을 이용하였으며, 제한효소는 *PspEI*과 *HaeIII* 두 종류를 사용하였다. 먼저 6개의 표준균주를 대상으로 하여 검사를 시행하였는데, 모두 각 균종에 합당한 결과를 얻었다. 임상 검체에서 분리된 88균주는 *M. tuberculosis*가 81균주(92%), 비결핵성 마이코박테리아가 7균주(8%)로 동정되었다. 비결핵성 마이코박테리아의 비율은 전체 균주의 8%로, 이는 전 등²⁰⁾의 3.9% 보다는 높았으나 Telenti 등¹²⁾의 67% 보다는 상당히 낮아 우리 나라는 아직까지 *M. tuberculosis*에 의한 감염이 대부분임을 알 수 있었다. 하지만 본 연구에서는 단지 본원에서 분리된 88균주만을 대상으로 한 결과이므로, 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 앞으로 더 많은 지역의 임상 분리균주에 대한 검사가 필요하리라 생각된다.

7균주의 비결핵성 마이코박테리아는 *M. avium*이 2균주, *M. intracellulare*가 2균주, *M. fortuitum*이 2균주, 그리고 *M. gordonae*가 1균주로 동정되었다. *M. avium*과 *M. intracellulare*는 통상적인 생화학적 검사로는 분리동정이 어려운 것으로 알려져 있으나 본 검사법으로는 쉽게 동정이 가능하였으며, 전체 7균주 중 4균주(57%)로 가장 높은 비율로 분리 동정되었다. *M. avium*은 AIDS 등의 환자에서 전신성 질환을 유발하는 경우가 많으므로 이러한 환자들에서 각 종의 정확한 동정은 임상적으로 의미가 있을 것으로 여겨지며, 본 연구에서는 대상으로 한 환자 중 AIDS환자는 없었고 4균주 모두 객담에서 분리된 것이었다⁴⁾. *M. fortuitum*은 biovariant *fortuitum*, biovariant *peregrinum*, 그리고 biovariant "third group"으로 구분되는데, 본 연구에서는 두 균주 모두 *M. fortuitum* biovariant *peregrinum*으로 동정되었다. 이들은 모두 객담에서 분리된 것으로, 그 임상적 의미는 환자의 임상 증상 및 여러 가지 요인에 의해서 판단되어야 할 것으로 생각된다. 한편 Pliakytis 등¹³⁾에 의하면 *M. gordonae*는 각 균주의 intraspecific difference에 의해 매우 다양한 RFLP 양상을 나타낸다고 하며, 저자들의 경우는 *M. gordonae* III로 동정되었다. 이 균도 역시 객담에서 분리되었으며 이 균종은 대부분 실제 감염균이라기 보다는 오염균으로 분류되는 경우가 많으며, 정확한 판단을 위해서는 더 많은 연구가 이루어

져야 할 것이다.

본 연구에서 *M. avium*을 제외한 비결핵성 마이코박테리아의 동정은 제한효소에 의한 RFLP 양상으로 이루어졌는데, 그 결과 해석에 있어서 주의해야 할 점은 제한효소에 따라서 다른 균이 동일한 양상을 나타낸다는 것이다. 저자의 경우 제한효소 *PspEI*으로 처리했을 때 *M. tuberculosis*와 *M. fortuitum*이 동일한 양상을 나타냈고, *M. avium*과 *M. kansasii*가 동일한 양상을 나타냈다. 그러나 *HaeIII*로 처리한 경우에는 두 균주가 서로 다른 양상을 나타내 두 결과를 조합하면 균 동정에는 큰 어려움이 없었다. 따라서 정확한 동정을 위해서는 반드시 2~3종류의 서로 다른 제한효소처리가 필요할 것으로 생각된다.

문헌보고에 따르면 제한효소를 이용한 마이코박테리아 동정법의 경우 전체 균주의 약 5~10%에서는 중 수준에서의 동정이 어렵다고 알려져 있다¹²⁾. 그러나 이러한 균주들은 대부분 인체에 병원성이 없는 오염균일 가능성이 많으며, 더 정확한 동정이 필요한 경우에는 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석이나 통상적인 생화학적 검사를 시행해야 한다. 본 연구의 경우에는 88개의 임상 분리균주 모두 동정이 가능하여 더 이상의 검사는 필요하지 않았으며, 이는 대상으로 한 균주 수가 많지 않았고 또한 다른 보고에 비해 상대적으로 비결핵성 마이코박테리아의 수가 적었기 때문으로 여겨진다.

결론적으로 다중 중합효소연쇄반응 및 제한효소 RFLP 양상을 이용한 마이코박테리아의 동정은 임상 검사실에서 쉽게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : 최근 비결핵성 마이코박테리아(nontuberculous mycobacteria, NTM)에 의한 인체감염이 증가하면서, 종(species) 수준에서의 마이코박테리아 동정에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 저자들은 다중 중합효소연쇄반응 및 제한효소에 의한 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 양상을 관찰함으로써 마이코박테리아를 동정해 보고자 하였다.

방 법 : 마이코박테리아 표준균주 6주와 임상검체에서 분리된 88균주를 대상으로 하였다. 마이코박테리아에 공통적으로 존재하는 65-kDa 유전자에 대한 시발체와 *M. tuberculosis*, *M. avium* 유전자에 각각 특이적인 시발체(primer)를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응을 시행한 후 제한효소 *PspEI*, *HaeIII*로 처리하여 RFLP 양상을 관찰함으로써 마이코박테리아를 동정하였다.

결 과 : 6개의 표준균주는 각각에 합당한 결과를 나타냈다. 88개의 임상 분리균주는 *M. tuberculosis* 81균주, *M. avium* 2균주, *M. intracellulare* 2균주, *M. fortuitum* biovariant *peregrinum* 2균주, *M. gordonae* III 1균주로 동정되었다.

결 론 : 다중 중합효소연쇄반응 및 제한효소 RFLP를 이용한 마이코박테리아의 동정은 임상 검사실에서 쉽게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Shinnick TM, Good RC: *Mycobacterial taxonomy*. Eur J Clin Microbiol 13:884, 1994
- Horsburgh CR: *Mycobacterium avium complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome*. N Eng J Med 324:1332-1338, 1991
- Wolinsky E: *Mycobacterial diseases other than tuberculosis*. Clin Infect Dis 15:1-12, 1992
- Wallace RJ, O'Brien R, Glassorth J, Raleigh J, Dutt A: *Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria*. Am Rev Respir Dis 142:940-953, 1990
- Debrunner M, Salfinger M, Brandli O, VON Graevenitz A: *Epidemiology and clinical significance of nontuberculous mycobacteria in patients negative for human immunodeficiency virus in Switzerland*. Clin Infect Dis 15:330-345, 1992
- Cage GD: *Direct identification of Mycobacterium species in BACTEC 7H12B medium by high-performance liquid chromatography*. J Clin Microbiol 32:521-524, 1994
- Kaminski DA, Hardy DJ: *Selective utilization of DNA probes for identification of Mycobacterium species on the basis of cord formation in primary BACTEC 12B cultures*. J Clin Microbiol 33:1548-1550, 1995
- Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, Hatanaka Y, Asano K, Hashimoto Y et al.: *Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 Mycobacterium species*. J Clin Microbiol 29:1596-1603, 1991
- Vaneechoutte M, Beenhouwer HD, Claeys G, Verschraegen G, Rouck AD, Paepe N et al.: *Identification of Mycobacterium species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis*. J Clin Microbiol 31:2061-2065, 1993
- Avaniss-Aghajani E, Jones K, Holtzman A, Aronson, T, Glover N, Boian M et al.: *Molecular technique for rapid identification of Mycobacteria*. J Clin Microbiol 34:98-102, 1996
- Cormican M, Glennon M, Riain UN, Flynn J: *Multiplex PCR for identifying mycobacterial isolates*. J Clin Pathol 48:203-205, 1995
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T: *Rapid identification of Mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis*. J Clin Microbiol 31:175-178, 1993
- Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, Shinnick TM: *Differentiation of slowly growing Mycobacterium species, including Mycobacterium tuberculosis by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis*. J Clin Microbiol 30:1815-1822, 1992
- Fiss EH, Chehab FF, Brooks GF: *DNA amplification and reverse dot blot hybridization for detection and identification of Mycobacteria to the species level in the clinical laboratory*. J Clin Microbiol 30:1220-1224, 1992
- Perosio PM, Frank TS: *Detection and species identification of Mycobacteria in paraffin sections of lung biopsy specimens by the polymerase chain reaction*. Am J Clin Pathol 100:643-647, 1993
- Cormican M, Barry T, Gannon F, Flynn J: *Use of polymerase chain reaction for early identification of Mycobacterium tuberculosis on positive cultures*. J Clin Pathol 45:601-604, 1992
- Wilton S, Cousins D: *Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube*. PCR Methods Appl 1:269-273, 1992
- Shinnick TM: *The 65-Kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 169:1080-1088, 1987
- 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 135:1007-1014, 1987
- 전창호, 하경임, 고은하, 이영현, 양창현: 단일시험관 중합효소연쇄반응을 이용한 인형결핵균과 비인형결핵균의 감별검출. 대한임상병리학회지 15:74-82, 1995