

폐결핵 또는 유사폐결핵 환자의 객담에서 분리된 Mycobacteria 제 II군(암발색군)의 균종동정*

중앙대학교 의과대학 미생물학교실

최철순 · 신성수 · 정상인 · 양용태

대한결핵협회 결핵연구원

김 상 재 · 배 길 한

- Abstract -

Species Identification of Mycobacteria of Group II Isolated from Sputa of Patients with Pulmonary Tuberculosis and Tuberculosis-like Diseases

Chul-Soon Choi, Sung-Soo Shin, Sang-In Chung and Yong-Tae Yang

Department of Microbiology, Chung-Ang University, College of Medicine, Seoul 151, Korea

Sang-Jae Kim and Kill-Han Bai

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul 150, Korea

Species of scotochromogenic mycobacteria of Group II isolated from sputa of patients with pulmonary tuberculosis and tuberculosis-like diseases from 1979 to 1984 were identified by simple biochemical tests using nitrate reduction, Tween-80 hydrolysis, arylsulfatase and urease test, and serotypes of the isolates belonging to *M. scrofulaceum* were differentiated by bacterial agglutination test.

Of 39 strains tested, 11 (28.2%) proved to be *M. scrofulaceum*, 15 (38.5%) *M. flavescens* and 13 (33.3%) *M. gordonae*. But none of the isolates belonged to *M. szulgai* and *M. xenopi* known as major pathogens of mycobacteria of Group II. Of 11 strains of the isolates identified as *M. scrofulaceum* 3 strains (27.3%) each belonged to serotype 41 and 42, and 4 strains (36.4%) belonged to serotype 43, but one strain was not typable because of its inagglutinability by any one of the type specific sera.

In addition, the sensitivity and specificity of rabbit immune sera against type strains of serotype 41, 42 and 43 of *M. scrofulaceum* were analysed by bacterial agglutination test. In the sensitivity of microplate test with 11 isolates of *M. scrofulaceum*, a comparative tandem test using 2 units and one unit of absorbed antisera against three serotypes appeared to be superior to a conventional microplate test using one unit of type specific antisera.

서 론

폐결핵환자의 객담에 대한 세균학적 검사에서 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 추가하여 항결핵균제에 높은 내성을 갖는 비정형 mycobacteria가 종종 분리되기 때문에 mycobacteria의 균종별 분류*이 연구는 1984년도 문교부학술연구 지원금에 의하여 수행되었음.

동정은 결핵의 치료는 물론 mycobacteria병의 전염병학적 연구에 중요하다.^{10, 11, 12, 13, 17, 20, 23, 24, 29)}

비정형 mycobacteria는 임상세균학적 분류의 편의 상 균의 발육속도와 색소생산의 특성에 따라 제 I군(광발색군), 제 II군(암발색군), 제 III군(광불발색군) 및 제 IV군(신속발육군)으로 분류한다.^{9, 10, 19, 20, 22)}

비정형 mycobacteria에 의한 mycobacteria병 유행율은 나라와 지역에 따라 0.1% 내지 50%로서 큰 차이가 있다.^{12, 20, 22, 29)} 우리나라의 경우 1979년부터 19

82년까지 국내에서 분리된 mycobacteria 균주 17,290 주에 대한 균종 및 균별조사에서 결핵균이 98.2%로서 대부분을 차지하고 비정형 mycobacteria는 0.2%로서 매우 낮은 분포를 나타내고 있다^{1,2,4,6)}.

그러나 비정형 mycobacteria는 많은 항결핵균제에 대하여 선천적 내성을 갖고 있기 때문에 항결핵균제의 장기투여에도 불구하고 치료효과가 나타나지 않는 결핵환자에서 분리되는 비정형 mycobacteria의 균종별 분류동정은 결핵의 치료는 물론 mycobacteria 병에 대한 전염병학적 연구자료로서 중요하다^{3,23)}.

지금까지 우리나라에서 분리되는 비정형 mycobacteria의 균별분류 조사에서 아직 제 I 균은 분리되지 않고 있으나 제 II 균과 제 III 균이 약 0.3%, 그리고 제 IV 균이 0.6%를 차지한다는 것이 밝혀졌다³⁾. 이 중에서 제 III 균과 제 IV 균의 균종에 관한 연구보고는 있으나^{4,6)}, 제 II 균의 균종별 분포에 대하여는 아직 확실히 조사되지 않았다.

그러므로 이 연구에서는 국내에서 분리되는 비정형 mycobacteria 제 II 균의 균종을 조사하기 위한 목적으로 1979년 부터 1984년 까지 국내에서 분리된 제 II 균(암발색균)에 대하여 생화학적검사에 의하여 균종을 동정하고 균체응집반응에 의하여 혈청형을 조사하였다.

재료 및 방법

1. Mycobacteria

1979년부터 1984년까지 대한결핵연구원과 서울 시내 종합병원에 결핵균의 분리 목적으로 의뢰된 객담에서 분리한 비정형 mycobacteria로서 제 II 균(암발색균)에 속하는 39주를 사용하였다. 비정형 mycobacteria 제 II 균에 속하는 표준균종은 National Institute of Allergy & Infections Disease, NIH, USA와 가축위생연구소 세균연구담당관실로 부터 분양 받은 균주를 사용하였다(표 1 참조).

모든 균주는(표 1) 분양한 후 곧 Tween-80 TB broth(Difco)에 접종하여 35°C에서 1주일간 배양한 다음 각 균주마다 단일 S 집락용 선별하기 위하여 TB broth 배양균액을 다시 Middlebrook 7H10 한천 평판에 선상도말하여 35°C에서 2주일간 배양하였다. 균주마다 1개의 S 집락용 따서 Löwenstein-Jensen 한천사면에 이식한 후 35°C에서 1주일간 다시 증균시켰다.

2. 세균의 동정

비정형 mycobacteria 제 II 균(암발색균)의 균종동정은 그림 1에서 보는 바와 같이 발육속도와 생화학적성상에 의한 2분분류법에 의하여 실시하였다^{15, 21, 25, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38)}.

1) 세균의 발육속도²¹⁾

제 II 균으로 추정되는 균주들이 지연형발육균 이

Table 1. Source of isolates and type strains of scotochromogens

Species	Strain	Source
Unidentified isolates Scotochromogens	39 strains	Isolated from sputa of patients with tuberculosis-like diseases in Tuberculosis Research Institute and University Affiliated Hospitals in Seoul from 1979 to 1984
<i>M. scrofulaceum</i>		
Serotype 41	Cardiff 2729 Bridge	NIAID, NIH, USA ^a "
Serotype 42	CDC 1198 P-29	" IVR, Anyang ^b
Serotype 43	M 150 Brooks	NIAID, NIH, USA "
<i>M. szulgai</i>	TMC 1328	"
<i>M. xenopi</i>	TMC 1470	"
<i>M. flavescens</i>	TMC 1451	"
<i>M. goodnae</i>	TMC 1318	"

^aDr. Darrel D. Gwinn, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20205, U.S.A.

^bDr. Yong D. Youn, Department of Bacteriology, Institute of Veterinary Research, Anyang 171, Korea

라는 것을 확인하기 위하여 TB broth에 1주일 간 발육된 균부유액을 3 mm 백금이로 1백금이씩 취하여 L-J 사면배지에 도말한 다음 광선의 노출을 막기 위하여 알루미늄박지로 싸서 35°C에서 3주일간 배양하였다. 배양후 7일까지 매일 배양을 검사하고 그후 1주일 간격으로 가시집락의 출현 유무를 검사하였다. 배양후 5일 이내에 세균집락이 관찰되는 것은 신속발육균으로 간주하여 실험에서 제외시키고, 집락이 5일 이후에 관찰되는 것만을 지연형 발육균 또는 중등도 신속발육균으로 인정하여 실험에 사용하였다.

2) 색소생산실험^{21, 22)}

L-J 사면배지 위에 세균집락이 관찰되면 3일 이내에 배양병 주위를 둘러싼 알루미늄박지의 상부 1/2 을 제거시킨 다음 균집락을 30W 형광등의 30cm 거리에서 1시간 조사하고 다시 알루미늄박지로 싸서 35°C에서 하루밤(약 18시간) 배양하여 광선의 노출부와 비노출부 간에 황색 또는 등황색 착색의 증강 유무를 조사하였다. 광선의 노출부와 비노출부에 모두 색소를 생산하는 것을 암발색균으로 분류하였다.

3) 초산염환원시험^{23, 24)}

초산염환원시험은 Virtanen의 방법²⁵⁾에 따라 실

시하였다. 즉, 1/4 OZ McCartney병에 5 ml 피펫트로 멸균중류수 3적을 각각 분주하고 L-J 사면배지에서 3~4주일간 발육된 균괴를 3 mm 백금이로 1백금이씩 취하여 균부유액을 만들었다. 여기에 0.01 M NaNO₃ 수용액(NaNO₃, 0.085 g, KN₃PO₄, 0.117 g, Na₂HPO₄ 12H₂O 0.485g/100 ml 중류수) 2 ml를 가하여 잘 진탕한 다음 37°C 탕수조에서 2시간 가온하였다. 가온이 끝난 다음 곧 2배희석 HCl수용액 1적과 0.2% sulfanilamide수용액 2적 및 0.1% n-naphthylethylene diamine dihydrochloride수용액 2적을 Pasteur 피펫트로 각각 가하여 혼합한 다음 실온에 정치하였다. 판독은 시약을 가한 후 1분 이내에 적색을 나타내는 것을 양성으로 판정하였다. 반응의 강도는 분홍색을 1+로 하고 진홍색을 4+로 표시하였다. 음성반응을 보이는 것은 아연분말을 조금씩 가하여 초산염환원을 일으켜 적색 반응을 보이는 것을 확인하였으며 이때 발색이 없는 것을 양성으로 판정하였다.

4) Tween-80 가수분해시험^{24, 25)}

균체의 lipase에 의한 Tween-80 가수분해시험은 Wayne et al.²⁶⁾의 방법에 의하여 실시하였다.

즉, 0.076 M 인산완충액 100 ml (1/15 M Na₂HPO₄,

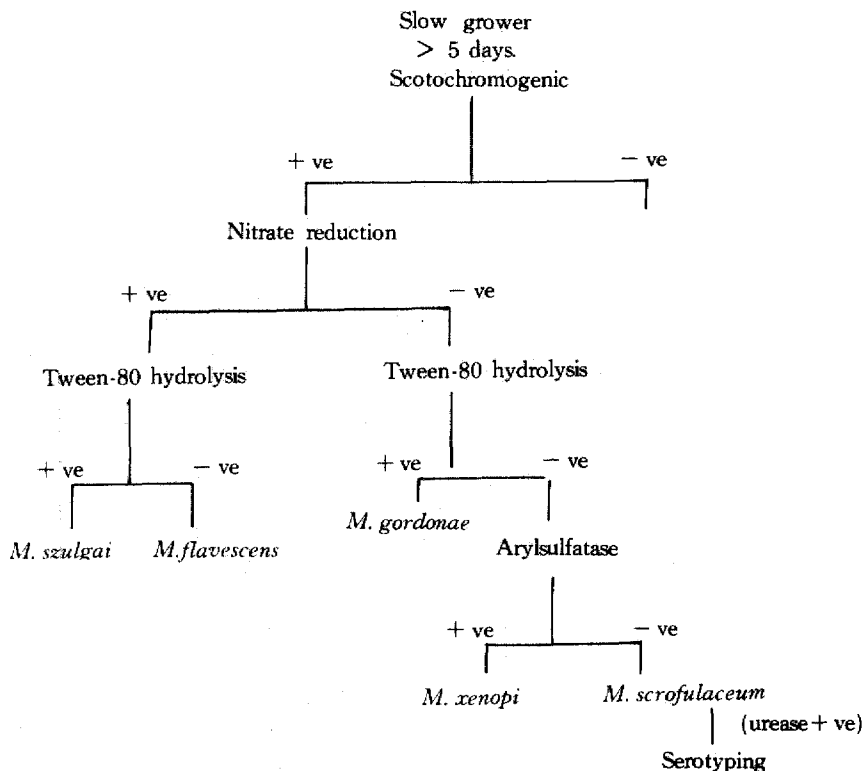


Fig. 1. Dichotomous key for the presumptive identification of scotochromogenic mycobacteria.

61.1 ml + 1/15 M KN₃PO₄, 38.9 ml, pH 7.0)에 Tween-80 0.5 ml와 0.1% neutral red 수용액 2 ml를 혼합하여 스크류캡 시험관에 3 ml씩 분주한다. 다음 121°C에서 15분간 멸균하였다. 실험은 이 배지에 L-J사면 배지에 발육된 균괴를 1 백금이 섞 취하여 접종한 다음 35°C에서 10일간 배양하였다.

관독은 배양 3일 후 1차 관독하고 그 후 매일 관찰하였다. 배지 색깔이 갈황색 (straw yellow)에서 적색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였다.

5) Arylsulfatase 시험¹⁶⁾

균체의 arylsulfatase 생성 시험은 Kubica¹⁵⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 0.65% tripotassium phenolphthalin disulfate 기질 배지 (기질 65 mg + glycerol 1 ml + Dubos Oleic agar base 100 ml)를 1/4 OZ McCartney 병에 2 ml씩 분명한 다음 121°C에서 15분간 멸균하였다. 검사는 발육이 왕성한 TB broth 균액 10 ml를 대형 백금기로 취하여 배지면에 접종한 다음 35°C에서 3주간 배양하였다. 관독은 배양 3일에 1 M Na₂CO₃ 수용액 1 ml를 배양액 위에 중층시킬 때 적색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였다.

6) Urease 시험²⁴⁾

Wayne 등²²⁾의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 한천이 함유되지 않은 bactor urea agar base (Difco)를 멸균 증류수에 10배로 희석하여 3 ml씩 분명한 다음 균액 1 백금이를 접종하여 35°C에서 3일간 배양하였다. 관독은 배양 3일에 배지가 적색을 보이는 것을 양성으로 판정하였다.

3. 혈청형 조사

생화학적 성상에 의하여 *M. scrofulaceum*으로 동정된 균주는 균체 응집 반응에 의하여 혈청형을 조사하였다.

1) 세균 부유액

항혈청을 생산하기 위한 면역용 세균 부유액은 Schaefer²³⁾의 방법에 따라 세균 부유액을 0.5% 설탕 산함유 인산완충식염수 (PPBS)에 희석하여 Bausch-Lomb 분광광도계를 이용하여 525 nm에서 22 mm의 경시험관의 흡광도 (OD)가 0.3 ± 0.05가 되도록 농도를 조절하였으며, 미량 평판 균체 응집 반응에 사용될 균 부유액의 OD가 0.45 ± 0.05가 되도록 균체를 PPBS에 희석하여 농도는 조절하였다.

2) 형 특이 면역 혈청

M. scrofulaceum serotype 41, 42 및 43의 3개 혈청형에 대한 토끼 면역 혈청은 Schaefer²³⁾의 방법에 따라 만들었다. 즉, 면역 항원 2 ml를 5일 간격으로 토끼에 5회 면역하였다. 마지막 주사 후 제 3일에 이 정맥에서 혈액을 일부 뽑아 혈청을 분리한

다음 균체 응집 반응에 의하여 혈청의 항체가 1:160 이상 될 때 완전 채혈하였다. 항체가 낮은 개체는 균 부유액 1 ml를 5일 간격으로 계속 주사하였다. 모든 혈청은 1 ml씩 분병하여 -30°C에 동결 보존하였다. 응집 반응에 사용될 혈청은 0.3% PPBS에 적당한 배수로 희석하여 56°C에서 30분간 비동화한 다음 실험에 사용하였다.

3) 균체 응집 반응

미량 평판 균체 응집 반응은 저자들의 전회의 보고⁸⁾에서와 같이 실시하였다. 즉, 시험관에서 2단계 또는 10단계로 미리 희석된 혈청의 높은 희석 배수에서부터 시작하여 낮은 희석 배수로 향하여 microdropper로 25 μl씩 U형 미량 평판 (Cooke Engineering Co.)의 각 구멍에 분주하고 각 혈청형의 균 부유액을 25 μl씩 가하여 잘 혼합하였다. 이것을 비닐주머니 속에 넣어 35°C에서 2시간 반응시킨 다음 다시 실온에 하루밤 정치하여 균체 응집을 조사하였다. 각 항혈청의 항체가는 완전 응집 (4+)을 보이는 최종 혈청 희석 배수를 항혈청의 최종 항체가 (1단위)로 결정하였다.

4) 항혈청의 흡수 시험

각 혈청형간에 일어나는 비특이 반응을 제거하기 위하여 항혈청 1 ml를 이형 균 부유액의 원액 3 ml와 혼합하여 5°C에서 48시간 정치하여 흡수한 다음 2,000 rpm에서 10분간 원침하여 얻은 상청액을 1:4 희석 흡수 혈청으로 사용하였다.

5) 분리 균주의 혈청형 조사

흡수 혈청을 이용한 균체 응집 반응에 의하여 혈청형을 조사하였다. 즉, 3개 흡수 혈청의 2단위, 1단위 및 0.5단위의 항체가 함유 되도록 희석된 혈청을 미량 평판의 구멍에 1 열로 25 μl씩 분주하고 여기에 검사될 각 세균 부유액 25 μl를 가하여 잘 혼합한 다음 위에서와 같은 방법으로 균체 응집 반응을 실시하였다. 혈청형의 판정은 균체 응집 항체가 가장 높거나 균체 응집괴의 형성이 가장 큰 혈청형에 따라 판독하였다. 균체 응집 반응의 판독이 불확실할 때는 평판을 가볍게 진탕하여 응집괴의 소실 유무를 조사하고 실온에 24시간 계속하여 정치한 다음 다시 판독하였다.

성 적

1. 비정형 mycobacteria 제 II 군의 균종 동정

유사 폐결핵 환자에서 분리된 비정형 mycobacteria 제 II 군 (암발색균) 39주에 대한 생화학적 성상을 조사한 성적은 표 2와 같다.

즉, 제 II 군에 속하는 39주의 분리 균주는 생화학

적성상에 의하여 *M. scrofulaceum* 11주(28.2%), *M. flavescens* 15주(38.5%) 및 *M. gordonae* 13주(33.3%)로 동정되었다. 그러나 *M. xenopi*와 *M. szulgai*의 성상을 갖는 균주는 없었다.

2. *M. scrofulaceum*의 3개 혈청형간의 균체응집 반응

M. scrofulaceum serotype 41, 42 및 43간의 균체응집 반응의 민감성과 특이성을 조사하기 위하여 3개 표준형 균주항혈청의 동형 및 이형균주에 대한 균체응집반응을 실시하여 항체가를 비교한 성적은 표 3과 같다.

즉, serotype 41의 Cardiff항혈청은 동일균주 균부유

액과는 1:640의 항체가를 보였으나 동일형의 다른 균주 Bridge균부유액과는 1:40의 가장 낮은 항체가를 보였다. 또한 동일형인 Bridge항혈청의 동형균주에 대한 항체가는 역시 이형균주에 대한 항체가와 유사하거나 오히려 더 낮았다. 그러므로 serotype 41항혈청은 Cardiff항혈청을 표준형항혈청으로 사용하였다. Cardiff항혈청을 serotype 42인 P-29 균체로 흡수할 때 이 흡수혈청은 동일균주의 균부유액과는 1:64의 높은 항체가를 보였으나 동형의 Bridge균주와는 역시 낮은 항체가를 보였다. Serotype 42인 P-29와 CDC 1198에 대한 면역혈청은 동일형균주와는 1:640 및 1:320으로서 이형균주에 대한 항체가 (1:40~1:160)에 비하여 모두 2~4배의 높은 항체가를

Table 2. Biological properties of 39 strains of scotochromogenic mycobacteria isolated from sputa of patients with tuberculosis and tuberculosis-like diseases

Nitrate reduction	Tween-80 hydrolysis	Arylsulfatase >1+ in 3 days	Urease	Photosensitivity ^a	No. of strain(%)	Species identified
-	-	-	+	-	7	<i>M. scrofulaceum</i>
-	-	-	+	+	4	"
				Total	11(28.2%)	
+	-	-	+	-	13	<i>M. flavescens</i>
##	+	-	-	-	2	"
				Total	15(38.5%)	
-	##	-	+	-	10	<i>M. gordonae</i>
			-	-	3	"
				Total	13(33.3%)	

^aInoculated on L-J slants containing *Gardenia jasminoides*(crocin) extracts and incubated at 35°C for 3 weeks with entire tube shielded from light until isolated colonies appear. Colonies was exposed to light 30w at 30cm distance for 1hr and incubated further at 35°C for 18hr. Pigmentation of colonies exposed and shielded was compared.

Table 3. Bacterial agglutination test with type strains of *M. scrofulaceum* serotype 41, 42 and 43 against homologous and heterologous antisera

Antiserum	Absorption ^a with	Serotype 41		Serotype 42		Serotype 43	
		Cardiff	Bridge	P-29	CDC 1198	M150	Brooks
41 Cardiff	-	640 ^b	40	320	160	40	80
	42 P-29	64	16	16	16	8	16
Bridge	-	40	80	80	80	40	40
	42 P-29	80	80	640	320	160	80
42 P-29	-	8	8	64	32	8	8
	41 Cardiff	8	8	64	32	8	8
CDC 1198	-	40	40	320	320	40	40
	42 P-29	8	8	16	8	128	64
43 M150	-	80	80	320	80	1280	320
	42 P-29	8	8	16	8	128	64
Brooks	-	80	80	640	640	1280	640
	42 P-29	8	8	16	8	128	64

^aOne ml of undiluted antiserum was mixed with 3 ml of bacterial suspension of a strain of each coagglutinating type. The mixture was incubated at 5°C for 48 hr and centrifuged at 2000rpm for 10 min. The serum was decanted and its homologous and heterologous titres were determined by using suspensions of two homologous and two heterologous strain of each serotype.

^bReciprocal dilution of serum shown the complete bacterial agglutination

갖고 있었다. 그러나 serotype 42에 대한 표준항혈청은 항체가 높은 P-29항혈청을 사용하였다. P-29 항혈청을 serotype 41 Cardiff균체로 흡수할 때 흡수혈청은 동일항혈청에 대한 항체가 (1:32~1:64)는 이형균주에 대한 항체가(1:8)에 비하여 4~5배의 더 높은 항체가의 차이를 나타냈다. Serotype 43에 속하는 M150과 Brooks균주에 대한 항혈청은 M150과는 1:1,280의 높은 항체가를 보였으나 Brooks균주와는 1:320~1:640으로 다소 낮았다. Serotype 43에 속하는 Brooks항혈청의 동일균주에 대한 항체가는 serotype 42에 속하는 P-29 및 CDC 1198 균주와 1:640의 동일한 항체가를 보였으나 serotype 41에 속하는 Cardiff 2729와 Bridge와는 1:80으로 낮은 항체가를 보였다. 그러므로 serotype 43에 대한 흡수항혈청은 M150항혈청을 serotype 42인 P-29균주로 흡수하여 만들었다. 동흡수혈청은 serotype 43과는 1:64~1:128로서 이형균주에 대한 항체가 1:8~1:16에 비하여 4~8배의 높은 항체가의

차이를 보였다.

3. *M. scrofulaceum* 분리균주의 혈청형

이 연구에서 생화학적 성상에 의하여 *M. scrofulaceum*으로 동정된 11주에 대한 혈청형을 조사하기 위하여 serotype 41, 42 및 43의 3개 흡수혈청의 2단위, 1단위 및 0.5단위의 항체가를 갖는 혈청희석액 25 μ 와 균체부유액 25 μ 를 혼합하여 균체응집을 비교한 성적은 표 4와 같다.

즉, *M. scrofulaceum*으로 동정된 분리균주 11주 중에 1주를 제외하고 10주는 형별분류가 가능하였다. 즉, 분리균주 11주 중에 serotype 41과 42에 속하는 것이 각각 3주(27.3%)이었으며, serotype 43에 속하는 것이 4주(36.4%)이었다.

이 연구에서 성적에는 나타내지 않았으나 균체응집반응은 비흡수혈청을 사용할 때는 강한 교차반응으로 형별분류가 불가능하였다. 흡수혈청을 사용할 때 형별간의 교차반응은 계속 관찰되었으나 흡수혈

Table 4. Bacterial agglutination of 11 strains of *M. scrofulaceum* isolated from sputa of patients with tuberculosis and tuberculosis-like disease to two-units, one unit and a half unit of absorbed antisera against serotype 41, 42 and 43

Strain No.	Serotype 41			Serotype 42			Serotype 43			Control	Serotype identified
	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5 unit		
597	3 ^a	2	2	1	1	1	1	1	1	±	41
1581	3	1	-	1	-	-	-	-	-	-	
2188	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
1401	3	2	1	4	3	2	3	1	1	-	42
1402	2	-	-	3	2	1	2	1	1	-	
1407	-	-	-	3	2	2	1	1	-	-	
1400	3	-	-	2	1	1	4	4	3	±	43
1410	3	3	2	-	-	-	4	4	3	-	
1417	1	-	-	-	-	-	3	3	1	-	
1579	-	-	-	-	-	-	3	2	2	-	
1430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

^aBacterial agglutination 3+ ; - not agglutinated

Table 5. Sensitivity of bacterial agglutination of 10 strains of *M. scrofulaceum* to two-units, one unit and a half unit of homologous antiserum

Serotype	No. of strain tested	Number of positive strain		
		2 units	1 unit ^a	0.5 unit
41	3	3 ^b	0	0
42	3	3	1	0
43	4	4	3	2
Total(%)	10(100)	10(100)	4(40)	2(20)

^aOne unit of absorbed serum represents a reciprocal dilution of sera shown complete(4+) bacterial agglutination with homologous strain of the same serotype

^bNumber of strain shown >3+ bacterial agglutination to homologous antiserum absorbed with heterologous serotype

청의 2단위 및 1단위 항체를 갖는 비교균체응집 반응으로 혈청형의 감별이 가능하였다.

이 연구에서 혈별동정이 가능한 10주의 3개 흡수혈청의 2단위, 1단위 및 0.5단위 항체에 대하여 3+ 이상의 균체응집을 보인 균주는 각각 10주(100%), 4주(40%) 및 2주(20%)로서 2단위 항체를 사용할 때 민감성이 가장 높았다(표 5 참조).

고 찰

이 연구에서 폐결핵 또는 유사폐결핵으로 의심되는 환자의 객담에서 분리된 비정형 mycobacteria 제 II군(암발색군)에 속하는 39주에 대하여 생화학적 성상에 의한 균종동정을 실시한 결과 *M. scrofulaceum* 11주(28.2%), *M. flavescens* 15주(38.5%) 그리고 *M. gordonae* 13주(33.3%)로 동정되었다. 그러나 제 II군으로서 주요 병원균종에 속하는 *M. xenopi*와 *M. szulgai*의 성상을 갖는 균주는 없었다. 이 성적은 우리나라에서 분리되는 비정형 mycobacteria 제 II군으로서 병원균의 주종균은 *M. scrofulaceum* 이라는 것을 의미한다. 이 성적은 미국, 유럽지역 그리고 일본에서의 성적과 일치한다^{11, 12, 20, 23, 24, 29}. *M. xenopi*와 *M. szulgai*는 *M. scrofulaceum*과 같이 유사폐결핵질환을 일으키고 1차 항결핵약제에 높은 내성을 갖는 병원균으로 치료에 새로운 문제점이 되고 있다^{18, 28, 29}.

그러나 이 연구에서 사용된 균주가 수적으로 매우 적기 때문에 국내에서 *M. szulgai*와 *M. xenopi*에 의한 유사폐결핵의 발생이 전혀 없다고 단정하기는 어렵다. 이들이 배양온도에 민감하며 다른 비정형 mycobacteria보다 발육이 매우 느리다는 점을 감안하여 앞으로 분리배양에 유의하고 더 많은 균주를 전국적으로 수집하여 균종의 동정시험을 실시함으로써 확실히 밝혀질 것이다.

그러나 이 연구에서 흥미있는 것은 항결핵제의 장기투여를 받은 만성폐결핵 또는 유사폐결핵환자의 객담에서 병원성이 없다고 생각되는 *M. flavescens* (38.5%)와 *M. gordonae*(33%)가 병원균인 *M. scrofulaceum*(28.2%)과 같이 높은 분리율을 보인다는 점이다. 이러한 성적은 이들 3종의 균종이 폐결핵 또는 유사폐결핵의 1차적인 원인균이라고 생각하기 보다는 만성폐결핵환자가 주위환경으로부터 2차적으로 오염되거나 감염되었다고 추정된다. 일반적으로 *M. gordonae*와 *M. flavescens*는 음로수와 토양을 포함한 자연계에 널리 분포되어 있다^{21, 27}.

국내의 토양^{4, 6, 7} 및 동물^{5, 8}에서 분리된 비정형 mycobacteria 제 II군에 대한 균종조사에서 *M. scrofulaceum*, *M. flavescens*와 *M. gordonae*는 동정되었으나, *M. xenopi*와 *M. szulgai*는 역시 동정되지 않았다. 그러나 항결핵약제의 장기투여 폐결핵 또는 유사폐결핵환자에서 분리되는 *M. flavescens*와 *M. gordonae*가 전혀 병원성이 없는 것인지에 대하여는 확실히 알 수 없으며 앞으로 해결되어야 할 중요한 연구과제이다.

오늘날 *M. scrofulaceum*은 주로 어린이에서만 만성육아종성 경부림프절염을 일으키고 성인에서는 병원성이 없으나 면역결핍질환, 만성폐기종 및 만성 기관지염으로 손상된 폐에서 제 2차 감염원으로 작용한다는 것이 알려졌다²⁰. 그러므로 *M. flavescens*와 *M. gordonae*도 정상 성인에서는 병원성이 없지만 폐결핵환자와 기타 만성폐질환에서 2차 감염원의 역할을 할 가능성을 배제할 수 없다. 이러한 추정은 이 연구에 사용된 제 II군의 균주들이 항결핵균약제와 장기투여를 받은 만성 유사폐결핵 환자에서 분리된 것들이기 때문이다.

*M. scrofulaceum*은 균체항원구조에 의하여 serotype 41, 42 및 43의 3개 혈청형으로 분류되며²², 이 혈청형의 조사는 *M. scrofulaceum*에 의한 유사폐결핵질환과 어린이의 만성육아종성 경부림프절염의 전염병학적 연구에 중요한 자료가 된다.

*M. scrofulaceum*은 균체항원구조에 의하여 serotype 41, 42 및 43의 3개 혈청형으로 분류되며²², 이 혈청형의 조사는 *M. scrofulaceum*에 의한 유사폐결핵질환과 어린이의 만성육아종성 경부림프절염의 전염병학적 연구에 중요한 자료가 된다.

오늘날 *M. scrofulaceum*의 3개 혈청형의 조사는 흡수항혈청을 이용한 균체응집반응 또는 면역혈청의 최종 항체를 이용한 혈청형간의 비교균체응집 반응에 의하여 실시된다²². 그러므로 이 연구에서는 우선 *M. scrofulaceum*의 3개 혈청형에 대한 형특이 흡수혈청을 생산하여 항혈청의 민감성과 특이성을 조사하였다.

이 연구에서 성적난에는 기술되지 않았으나 분리균주 10주는 3개 혈청형 면역혈청의 최종항체를 이용한 비교응집반응에서는 표준항혈청의 예비실험(표 3)에서와 같이 상호간에 높은 교차 반응을 보여 형별감별이 불가능 하였다. 그러므로 이 연구에서는 흡수혈청을 이용한 균체응집반응의 성적에 대하여만 기술하였다.

균체응집반응의 특이성은 비흡수혈청에 비하여 흡수혈청에서 훨씬 높았다. 그러나 혈별동정이 가능한 분리균주 10주는 흡수혈청 2단위에서 100%의 높은 민감성을 보였으나 1단위(40%)와 0.5단위(20%)에서는 민감성이 낮았다. 이와 같은 현상은 실험실균주와는 달리 분리균주의 균체항원의 민감성이 낮거나 또는 반응제에 사용된 1단위 항체가 희석과정에 정확한 1단위 항체가 함유되지 않았거나 희석혈청 속의 일부 항체가 응집반응에 사용된 평판의 구멍 내면에 흡착되어 실험체가 낮아졌기

때문이라고 추정된다. 그러나 흡수혈청을 이용한 균체응집반응에서 2단위 및 1단위 항체를 직렬로 이용한 직렬 비교균체응집반응(tandem test)이 1단위 항체를 이용한 단일 균체응집반응보다 형별감별이 민감하였다.

이 연구에서 생화학적 성상에 의하여 *M. scrofulaceum*으로 동정된 분리균주 11주 중에 1주를 제외하고 10주는 모두 3개 혈청형의 흡수혈청중에 한형의 2단위항체에 100% 균체응집반응을 보였다. 분리균주 10주는 serotype 41 및 42에 속하는 것이 각 3주(27.3%)이었으며 serotype 43에 속하는 것이 4주(36.4%)로서 국내에 분포하는 *M. scrofulaceum*의 3개 혈청형간에 차이가 없이 모두 유사폐결핵의 병원균으로 작용한 다는 것을 알 수 있었다.

결 론

폐결핵 또는 유사폐결핵 환자의 객담에서 분리되는 비정형 mycobacteria 제 II군(암발색균)의 균종의 분포를 조사하기 위한 목적으로 1979년 부터 1984년 까지 국내에서 분리된 mycobacteria 제 II군 39주를 대상으로 초산염화원, Tween-80 가수분해, aryl-sulfatase 및 urease 시험에 의하여 균종을 동정하였으며 *Mycobacterium scrofulaceum*으로 동정된 균주의 혈청형을 균체응집반응에 의하여 조사하였다. 또한 *M. scrofulaceum* 3개 혈청형에 대한 토끼면역혈청의 민감성과 특이성에 대하여 검토하였다. 연구의 성적을 요약하면 다음과 같다.

1. Mycobacteria 제 II군에 속하는 분리균주 39주는 생화학적 성상에 의하여 *M. scrofulaceum* 11주(28.2%), *M. flavescens* 15주(38.5%) 및 *M. goodii* 13주(33.3%)로 분류되었다. 그러나 mycobacteria 제 II군으로서 주요 병원균중에 속하는 *M. szulgai*와 *M. xenopi*의 성상을 갖는 균주는 없었다.

2. *M. scrofulaceum* 3개 표준 혈청형균주에 대한 면역혈청은 동형계반응에서 이형계반응에 비하여 다소 높은 항체가를 보였으나 높은 교차반응으로 형별분류에 직접 이용될 수 없었다. 그러나 흡수혈청은 동형계반응에서 이형계반응에 비하여 4~8배의 높은 항체가의 차이를 보였다.

3. *M. scrofulaceum*의 흡수혈청을 이용한 균체응집반응에서 흡수혈청의 2단위 및 1단위 항체를 이용한 직렬비교 균체응집반응이 1단위 항체를 이용한 단일 균체응집반응에 비하여 민감성이 높았다.

4. 직렬비교 균체응집반응에 의한 형별조사에서 *M. scrofulaceum* 분리균주 11주는 serotype 41과 42 각 3주(27.3%) 및 serotype 43이 4주(36.4%)이었

다. 그러나 1주(9.0%)는 3개 흡수혈청에 대하여 전혀 응집반응을 보이지 않아 형별분류가 되지 않았다.

이 성적은 폐결핵 또는 유사폐결핵환자의 객담에서 분리되는 병원성 mycobacteria 제 II군의 주종 균종은 *M. scrofulaceum*이며 3개 혈청형의 분포간에 차이가 없다는 것을 의미한다.

참 고 문 헌

- 1) 권혁진·최철순·정상인·양용태: 유사폐결핵환자의 객담에서 분리된 신속발육 Mycobacteria의 분류동정. 중앙의대지 9:39, 1984.
- 2) 김성진·김상재: 객담에서 분리된 미분류 항산균에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 17:33, 1970.
- 3) 김성진·김상재: 한국토양으로부터 분리된 미분류항산균에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 18:19, 1971.
- 4) 박정규: 결핵환자에서 분리된 항산균의 세균학적 연구. 충남의대잡지 7:415, 1980.
- 5) 이원창·서부갑·이강욱·김상재·김성진·서옥자: 우결핵에 관한 역학적 조사 및 세균학적 연구. 도축후우에서의 비정형항산균 감염에 관한 연구: 결핵 및 호흡기질환 22:165, 1975.
- 6) 최철순: 한국의 인체, 동물 및 토양에서 분리된 Mycobacterium의 균종. 한국수의공중보건학회지 5:49, 1981.
- 7) 최철순·양용태: 서울시내 초중고교 토양으로부터 비정형 Mycobacteria와 Nocardia의 분리. 대한미생물학회지 11:69, 1976.
- 8) 최철순·정상인·이기동·양용태·김상재·배길한: 폐결핵환자의 객담에서 분리된 Mycobacterium avium-intracellulare complex의 혈청형 조사. 대한미생물학회지 18:47, 1983.
- 9) Barksdale L and Kim KS: Mycobacterium. Bacteriol. Rev. 41:217, 1977.
- 10) Crow HE, King CT, Smith CE, Corpe RF and Stergus I: A limited clinical, pathologic and epidemiologic study of patients with pulmonary lesions associated with atypical acid-fast bacilli in the sputum. Am. Rev. Tuberc. Pulmon. Dis. 75:199, 1957.
- 11) Davidson PT: international Conference on Atypical Mycobacteria. Rev. Infect. Dis. 3:813, 1981.
- 12) Good RC: Nontuberculous mycobacteria. Clinical Microbiol. Newsletter 1:1, 1979.

- 13) Good RC and Snider DE Jr : Isolation of non-tuberculous mycobacteria in the United States, 1980. *J. Infect. Dis.* **146** : 829, 1982.
- 14) Kilburn JO, O'Donnell KF, Silcox VA and David HL : Preparation of a stable mycobacterial Tween hydrolysis test substrate. *Appl. Microbiol.* **26** : 826, 1973.
- 15) Kubica GP: Differential identification of clinically significant mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* **107** : 9, 1973.
- 16) Kubica GP and Good RC : The genus *Mycobacterium*, pp. 1962-1964. In Starr MP, Stolp H and Truper HG (eds). *The Prokaryotes. New York, Springer-Verlag Vol. II*, 1981.
- 17) Lincoln EM and Gilbert LA : Disease in children from other than *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Resp. Dis.* **105** : 683, 1972.
- 18) Marks J, Jenkins PA and Tsukamura M : *Mycobacterium szulgai*-a new pathogen. *Tubercle* **53** : 210, 1972.
- 19) Ratledge C and Stanford J : *The Biology of the Mycobacteria : Physiology, Identification and Classification.* *New York, Academic Press. Vol. 1* : 1982.
- 20) Runyon EH : Anonymous mycobacteria in pulmonary diseases. *Med. Clin. North Am.* **43** : 273, 1959.
- 21) Runyon EH, Karlson AG, Kubica GP and Wayne LG: *Mycobacterium*, pp. 150-179. In Lennette EH, Balows A and Hausler WJ Jr : *Manual of Clinical Microbiology.* 3rd ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1980.
- 22) Schaefer WB: Serological identification of atypical mycobacteria. p. 323-343. In Bergan T : and Norris JR(ed). *Methods in Microbiology.* *Academic Press, London.* 1979.
- 23) Tellis CJ and Putnam JS : Pulmonary diseases caused by nontuberculosis mycobacteria. *Med. Clin. North Am.* **64** : 433, 1980.
- 24) Toda T, Hgihara Y and Takeya K : A simple urease test for the classification of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* **83** : 757, 1960.
- 25) United States Department of Health, Education and Welfare : *Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria.* HE W Publication No. (CDC) 77-8230, 1977.
- 26) Virtanen S : A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Acta Tuberc. Scand. Suppl.* **48** : 1, 1960.
- 27) Wayne LG : On the identity of *Mycobacterium gordonae* Bojalil and the so-called tap water scotochromogens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20** : 149, 1970.
- 28) Wayne LG, Dietz TM, Gernez-Rieux C, Jenkins PA, Kappler W, Kubica GP, Kwapinski JB G, Meissner G, Pattyn SR, Runyon EH, Schroder KH, Silcox VA, Tacquet A, Tsukamura M and Wolinsky E : A cooperative numerical analysis of scotochromogenic slowly growing mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **66** : 255, 1974.
- 29) Wayne LG and Doubek JR : Classification and identification of mycobacteria. II. Tests employing nitrate and nitrite as substrate. *Am. Rev. Respir. Dis.* **91** : 738, 1965.
- 30) Wayne LG and Doubek JR : Diagnostic key to mycobacteria encountered in clinical laboratories. *Appl. Microbiol.* **16** : 925, 1968.
- 31) Wayne LG, Doubek JR and Russell R : Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate. *Am. Rev. Respir. Dis.* **90** : 588, 1964.
- 32) Wayne LG, Engbaek HC, Engel HWB, Froman S, Gross W, Hawkins J, Kappler W, Karlson AG, Kleeberg HH, Krasnow I, Kubica G P, McDurmont C, Nel EE, Pattyn SR, Schröder KH, Showalter S, Tarnok I, Tsukamura M, Vergmann B and Wolinsky E : Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium* : tests for pigment, urease, resistance to sodium chloride, hydrolysis of Tween 80, and β -galactosidase. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24** : 412, 1974.
- 33) Wayne LG, Engel HWB, Grassi C, Gross W, Hawkins J, Jenkins PA, Kappler W, Kleeberg HH, Krasnow I, Nel EE, Pattyn SR, Richards PA, Showalter S, Slosarek M, Szabo I, Tarnok I, Tsukamura M, Vergmann B and Wolinsky E : Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium* : tests for niacin and catalase and for resistance to isoniazid, thiophene 2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine, and p-nitrobenzoate. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26** : 311, 1976.
- 34) Wayne LG, Good RC, Krichevsky MI, Beam

- RE, Blacklock Z, Chaparas SD, Dawson D, Froman S, Gross W, Hawkins J, Jenkins PA, Juhlin I, Kappler W, Kleeberg HH, Krasnow I, Lefford MJ, Mankiewicz E, McDermont C, Meissner G, Morgan P, Nel EE, Pattyn SR, Portaels F, Richards PA, Susch S, Schroder K H, Silcox VA, Szabo I, Tsukamura M, and Vergmann B; First report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31 : 1, 1981.
- 35) Wayne LG, Good RC, Krichevsky MI, Beam RE, Blacklock Z, David HL, Dawson D, Gross W, Hawkins J, Jenkins PA, Juhlin I, Kappler W, Kleeberg HH, Krasnow I, Lefford MJ, Mankiewicz E, McDermont C, Nel EE, Portaels F, Richards PA, Rusch S, Schroder KH, Silcox VA, Szabo I, Tsukamura M, Vanden L, Breen L and Vergmann B : Second report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33 : 265, 1983.
- 36) Wayne LG, Krichevsky EJ, Love LL, Johnson R and Krichevsky MI : Taxonomic probability matrix for use with slowly growing mycobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30 : 528, 1980.
- 37) Wayne LG, Krichevsky MI, Portyrata D and Jackson CK : Diagnostic probability matrix for identification of slowly growing mycobacteria in clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 20 : 722, 1984.
- 38) Wolinsky E : Non tuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.* 119 : 107, 1979.
- 39) Wolinsky E : The impact, clinical and epidemiological observations of human diseases, pp. 13-18. In Kubica GP, Wayne LG and Good LS Center of Disease Control, Atlanta, Ga, 1980.