Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 48, No. 3, Mar, 2000

□원 저□

서울의 한 대학병원에서 동정된 결핵균 균주의 RFLP 양상

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

김우진, 임재준, 이재호, 이춘택, 정희순, 한성구, 심영수, 김영환

= Abstract =

Restriction Fragment Length Polymorphism of *Mycobacterium Tuberculosis* in a University Hospital in Seoul

Woo Jin Kim, M.D., Jae-Joon Yim, M.D., Jae Ho Lee, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D., Hee Soon Chung, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim M.D., and Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* with RFLP is a very useful tool for deciphering the molecular epidemiology of tuberculosis. An international comparison of the RFLP pattern became possible with the proposal to standardize RFLP methodology using *Pvu*-II restricted IS-6110, and the comparison has noted some predominance of RFLP pattern in East Asia. The RFLP patterns of tuberculosis strains collected at SNUH was studied and was compared with other strains from East Asia.

Method : Fifty strains of *M. tuberculosis* were isolated from patients who visited or were admitted to the SNUH in 1998. Some isolates belonging to the Beijing family were also received. After the extraction of DNA from *M. tuberculosis* isolates, the chromosomal DNAs were digested with *Pvu*-II and analyzed by the Southern blot method with DNA probe to IS6110.

Result : Six strains belonged to the Beijing family. The RFLP patterns of other 9 strains were similar to each other. No statistically significant endobronchial tuberculosis, presence of underlying disease, and the province of

---

†본 연구는 1998년 결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 포스터 발표되었음.

Address for correspondence :
Young Whan Kim, M.D.
Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University College of Medicine
28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744, Korea
Phone : 02-760-2856 Fax : 02-761-3356 E-mail : ywkim@snu.ac.kr

residence were found.

Conclusion : Few groups of *M. tuberculosis* strains from SNUH showed similar RFLP patterns, but their clinical implications are not yet clear. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 308-314)

Key words : Tuberculosis, RFLP, Beijing family.

서 론

결핵균의 DNA 염기서열 중에 IS element가 불규칙하게 삽입되어 있으며, 그 수와 위치가 균주에 따라 다르고, 같은 종에서는 배양을 하더라도 그 안정성이 유지되기 때문에 이 IS element를 이용하여 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)를 확인하면 같은 종인지 다른 종인지 구별할 수 있다[1]. 그래서 이 방법으로 결핵균의 전파양식을 역학적으로 연구하기 위한 수단으로 RFLP가 많이 이용되었다.

최근에는 IS element 중에서 IS 6110을 이용한 국제적으로 표준화된 방법이 제시되면서 결핵균주간의 국제적인 비교가 가능해졌으며[2] 이후 표준화된 방법으로 시행한 결핵균주의 RFLP 양상이 국가별로 다르다는 것이 밝혀졌다. 예를 들어 유럽에서는 한 나라에서 수집된 결핵균주들의 RFLP 사이에 유사성이 거의 없었지만 아프리카에서는 한 나라에서 수집된 결핵균주들이 유사한 RFLP 양상을 보였다[3]. 또한, 중국과 몽고에서 동정된 결핵균주의 경우 75%가 유사한 RFLP 양상을 보이고 있으며, 이들은 Beijing family라고 불리우고 있다[4].

RFLP 양상이 서로 비슷한 모양을 보이는 경우는, 이 결핵균주들이 유전적으로 유사하다는 것을 시사하며, 진화단계에서 비교적 근래에 같은 조상에서 시작되었을 것으로 생각된다.

본 연구는 서울대병원에서 동정된 결핵균주의 RFLP 양상을 분석하여, Beijing family와 비교하고, RFLP 양상에 따른 임상적 차이가 있는지를 알아보기 위해 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1998년 1월에서 6월 사이에 서울대병원에 입원 또는 외래방문 환자의 객담에서 배양된 결핵균을 대상으로 균주의 일부를 채취하였다. 표지자로 사용하기 위한 H37Rv 표준균주는 결핵연구원에서 구입하였고, Beijing family 결핵균주의 DNA는 네덜란드의 National Institute of Public Health and Environmental Protection의 Jan D.A. van Embden에게 제공받았다.

2. 결핵균 DNA의 추출

임사 검체와 표준 균주는 80℃에서 20분간 가열하여 사멸시킨 후 mini-bead beater 법으로 DNA를 추출하였다. 1.5ml microcentrifuge tube에 결핵균 균주와 0.1mm Zirconium bead 200 $\mu\ell$, TEN 용액 100 $\mu\ell$, phenol/chloroform/isoamyl alcohol 용액 100 $\mu\ell$를 혼합한 후 mini-bead beater에서 3분간 처리했다. 검체를 3,000rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상층액 200 $\mu\ell$를 다른 microcentrifuge tube에 옮기고 chloroform/isoamyl alcohol 용액 200 $\mu\ell$를 넣고 3,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액 100 $\mu\ell$를 다른 microcentrifuge tube에 옮기고, 3M sodium acetate 10 $\mu\ell$와 100% 에탄올 220 $\mu\ell$를 넣고, -70℃ 냉동고에 15분간 방치한 후 10,000rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, 공기중에서 완전히 건조시켰다. 추출한 DNA

는 멸균 3차 증류수에 용해시켜 -20℃에서 보관하였다.

3. Probe

결핵 연구원에서 제공받은 M. bovis BCG의 DNA를 target DNA로 하고 이미 보고된 primer를 이용하여[5] IS 6110에 대한 probe를 만들었다.

4. Southern blot

임상 검체와 표준 균주에서 추출한 DNA와 Beijing family의 DNA 각각 1 μg을 *Pvu*-Ⅱ로 분해한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 10cm 길이의 gel을 만들어 denaturation과 neutralization 시킨 후 nylon membrane에 전이시켰다.

Membrane을 Oncor사의 Hybrisol I (50% formamide, 10% dextran sulfate, 1% SDS, blocking reagnet)으로 prehybridization 시킨 후 32P로 tagging한 IS6110에 대한 probe를 이용하여 hybridization을 시행하였다.

5. RFLP 분석

H37Rv의 RFLP 양상이 membrane마다 동일한지를 확인하였고 이를 기준으로 다른 균주들의 RFLP 양상을 비교하였다. Band의 위치가 3분의 2 이상 일치하는 경우에만 같은 균주군으로 판정하였다.

6. 임상적 비교

Beijing family로 분류된 군과 나머지 군에 대해 환자의 성별, 결핵균의 약제내성 여부, 기관지결핵 동반 여부, 기저질환 유무 등의 임상상의 차이가 있는지를 χ^2 test로 검정하였으며, 각 군 환자의 나이와의 관련성은 비모수적 검정인 Kruskal-Wallis test로 확인하였다.

결 과

1. RFLP 분석

50개의 결핵균 균주의 RFLP 양상을 확인할 수 있었으며(Fig. 1), band의 개수는 2-13개였다. 6개의 균주에서 band의 모양이 Beijing family의 band 모양과 3분의 2 이상 일치하였다. Band의 모양이 3분의 2이상 일치하는 것을 기준으로 하였을 때 31개의 균주를 7개의 군으로 나눌 수 있었다(Table 1). 나머지 19개의 균주들은 다른 균주의 RFLP band 모양과 유사성이 없었다. 또한 band 모양이 100% 일치하는 균주들은 없었다.

2. 임상적 비교

Beijing family로 판단한 6예, 가장 많은 균주들이 포함된 group A에 속한 균주 9예, 양쪽 어느 곳에도 속하지 않는 나머지 균주들의 임상상을 비교한 결과, 이 세 군간에 환자의 나이, 성별, 결핵균의 약제내성 여부, 기관지 결핵 동반 여부, 기저 질환 유무, 환자의 거주지역에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

고 찰

RFLP는 지역간의 결핵균 전파양식, 새로운 감염과

Table 1. Beijing family and several groups classified by similar RFLP patterns

Group	Number
Beijing family	6
group A	9
group B	5
group C	4
group D	3
group E	2
group F	2

Table 2. Clinical characteristics of the Beijing family, group A and other tuberculosis strains isolated in at SNUH

	Beijing family (n=6)	group A (n=9)	others (n=35)	p value
Age(year)	20.2±16.2	20.1±15.3	27.8±20.3	p=0.234
Sex				p=0.265
female	0	1	9	
male	6	8	26	
Drug resistance				p=0.741
resistant strains	2	3	8	
sensitive strains	4	6	27	
Endobronchial Tb				p=0.515
yes	0	1	6	
no	6	8	29	
Underlying disease				p=0.363
yes	3	3	8	
no	3	6	27	
Address				p=0.071
Seoul	3	0	23	
Kyongi-do	2	4	5	
Chungchung-do				0
Kyongsang-do	1	1	1	9
Cholla-do	0	1	1	3
Kangwon-do	0	1	1	

reactivation의 감별, 약제내성 균주의 병원내 전파 등을 연구하는데 매우 유용하게 이용되고 있으며, 최근에는 결핵균의 유전적 진화 및 약제내성의 유전적 단서를 연구하는 데에도 이용되고 있다[6].

RFLP 양상은 같은 균주내에서는 매우 안정하여 수년동안 결핵을 앓고 있는 환자에서 수년이 지나도 그 모양이 변하지 않는다고 보고되고 있다[7].

최근까지 여러나라에서 자국의 결핵균의 RFLP 양상에 대해 보고했는데, 결핵의 유병률이 낮은 나라에서는 IS6110의 다양성이 뚜렷한 반면 유병률이 높은 나라에서는 비교적 다양성이 적다고 보고되고 있다[1,3]. 특히, Beijing family의 경우, 이들은 유사한 RFLP 양상을 가질 뿐 아니라 유전적으로 유사하다고 보고되고 있어[8], 이들이 비교적 근래에 같은 조상의 균주에서 진화했음을 시사하고 있다.

본 연구에서도 RFLP 양상이 100% 일치하는 균주는 없었던 반면, 유사한 양상을 보이는 균주들이 많이 관찰되어 몇 개의 군으로 나눌 수 있었고, Beijing family 6예를 관찰할 수 있었고, 다른 9예에서 서로 유사한 양상을 보였다. 이는 국내에서도 비교적 근래에 Beijing family와 같은 조상의 균주들이 전파되었고, 이외에 같은 조상을 갖는 또다른 균주군이 있음을 시사하고 있다.

본 연구에서는 band의 수가 2개에서 13개까지 관찰되었으며 국내의 다른 연구에서는 대부분 9-10개의 band가 관찰되었다[9]. 일부 아시아 지역에서 IS6110 band가 한 개만 있는 균주가 많이 관찰되었다는 보고가 있으나[10], 본 연구에서는 1개의 band를 갖는 균주

는 전혀 없었다.

또한, band의 수가 5개 이하로 적은 경우 균주의 감별이 덜 민감해지며, IS6110의 위치가 이전에 생각하였던 것처럼 무작위가 아니고 특정 위치에 호발한다는 주장도 있어[11], band의 수가 적은 경우 비슷한 band 양상을 나타낼 가능성이 많이 있어 감별이 힘들어지고, 이런 경우에는 RFLP는 특이성이 떨어지고 다른 추가적인 보완이 필요하다[12]. 하나 또는 두 개의 RFLP band를 갖는 경우 spoligotyping이 유용하며[13], IS6110이외에 pTBN12 등과 같은 다른 유전자를 목표로 Southern blot을 시행하여 특이성을 높일 수 있다[14].

RFLP 양상의 비교는 본 연구에서는 50례의 비교적 적은 수의 비교였으므로 육안적인 비교에 의존하였다. 그러나, 200예 이상의 많은 수를 비교하기위해서는 컴퓨터를 이용한 분석이 필요하게 된다[6].

한편, RFLP 양상과 임상상과의 관련성에 대해서는 별다른 관계가 없다는 보고들이 많다. 약제내성의 경우 특정 지역의 환자들이 유사한 RFLP dd상을 보이면서 이 환자들에서 동정된 결핵 균주들이 약제 내성이 많았다는 보고가 있으나[15], 약제내성과 RFLP 양상과는 관계가 없었다는 보고도 있고[9], 처음에 약제감수성이었던 균주에서 약제내성이 생기더라도 IS6110 band 양상은 변하지 않는 경우도 관찰되고 있다[1,7]. 본 연구에서도 특정 균주군과 약제내성과는 연관성이 없었다.

이외에 나이, 성별, 기관지 결핵 여부, 기저질환의 유무와도 관련성이 없었다. 아시아의 다른 보고에서도 성별, 나이, 폐외결핵의 경우 병변부위와 RFLP 양상에는 관련성이 없었다[10].

본 연구에서 대상균주는 모두 HIV 음성의 환자에서 분리된 것이었으며, 외국의 보고에 의하면 HIV 여부와 RFLP 양상 사이에 연관성이 없었다[10].

환자가 살고있는 도를 기준으로 지역적인 관련성을 분석해 보았을 때, krr 군에 따른 지역적인 차이는 없었다. Beijing family는 중국, 몽고, 태국 등과 국내에도 다수 관찰되어 비교적 넓은 지역에서 퍼져있고, 태국에서만 주로 발견되는 Nonthaburi family[10]나 서울대병원에서 다수 관찰된 group A와 같이 일부 지역에 국한되어 관찰되는 균주군이 존재함을 알 수 있었다. 이들이 이 지역에서 많이 분포하게된 이유에 대해서는 좀더 연구가 필요할 것이다.

결론적으로 저자들은 본 연구를 통하여 서울대병원에서 분리된 결핵균주의 RFLP 양상에서 서로 유사한 균주 군이 존재함을 확인할 수 있었지만 이들의 임상적 의미는 찾지 못하였다.

요 약

연구배경 :

RFLP를 이용한 결핵균의 유전자 분석은 결핵의 분자역학적 연구에 유용하게 이용되고 있다. *Pvu*-II 효소를 이용한 RFLP 방법의 표준화로 RFLP 양상의 국제적인 비교가 가능해졌고, 극동아시아에서 RFLP 양상이 유사한 결핵균주의 군이 발견되었다. 저자들은 서울대병원에서 수집된 결핵균의 RFLP 양상을 분석하고 다른 극동아시아의 균주들과 비교하였다.

방 법 :

1998년 서울대병원에 입원했거나 외래 방문한 환자의 객담에서 분리하여 배양된 50개의 결핵균주를 대상으로 하였다. 결핵균주에서 DNA를 추출한 뒤, *Pvu*-II 로 소화시키고, IS6110에 대한 DNA probe를 이용하여 Southern blot을 시행하였다. 이들의 RFLP 양상을 비교하여 유사성이 있는 균주들을 같은 군으로 분류하였고, RFLP의 다양성의 정도와 각 군 간의 임상적인 차이가 있는지 알아보고자 하였다.

결 과 :

50개의 결핵균 균주 중에서 6예의 Beijing family를 확인하였고, 다른 9개의 균주가 한 군으로 분류되었다. 이들 균주 군간에 나이, 성별, 지역, 약제 내성, 기관지 결핵 동반 여부, 기저질환 유무 등의 임상상에서는 차이를 보이지 않았다.

결 론 :

서울대병원에서 분리된 결핵균주의 RFLP 양상에서

서로 유사한 균주 군이 존재함을 확인할 수 있었다. 그러나, 이들이 임상적으로는 큰 의미를 갖지 못하는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Soolingen D, Hermans PWM, Haas PEW, Soll DR, Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol 1991;29:2578-86.
2. Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strains identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : Recommendation for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31:406-9.
3. Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, Soolingen D, Haas PEW, Heersma H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and Netherlands. J Infect Dis 1995;171:1504-13.
4. Soolingen D, Qian L, Haas PEW, Douglas JT, Traore H, Portael F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J Clin Microbiol 1993;33:3234-38.
5. Hermans PWM, Soolingen D, Dale JW, Schuitemata ARJ, Mcadam RA, Catty D, et al. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1990;28:2051-58.
6. Cohn DL, O'Brien RJ. The use of restriction fragment length polymorphism analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:16-26.
7. Strassle A, Putnik J, Weber R, Fehr-Merhof A, Wust J, Pfyffer GE. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a human immunodeficiency virus cohort in Switzerland. J Clin Microbiol 1997;35:374-8.
8. Namwat W, Luangsuk P, Palittapongarnpim P. The diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Thailand studied by amplification Sof DNA segments containing direct repetitive sequences. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:153-9.
9. Huh YJ, Ahn DI, Kim SJ. Limited variation of DNA fingerprints in Korean strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle Lung Dis 1995;76:324-9.
10. Palittapongarnpim P. Luangsuk P, Tansuphaswadikul S, Chuchottaworn C, Prachaktam R, Sathapatayavongs. Restriction fragment length polymorphism study of *Mycobacterium tuberculosis* in Thailand using IS6110 as probe. Int J Tuberc Lung Dis 1997;1:370-6.
11. Mchugh TD, Gillespie SH. Nonrandom association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998;36:1410-13.
12. Burman WJ, Reves RR, Hawkes AP, Rietmeijer CA, Yang Z, El-hajj H, et al. DNA fingerprinting with two probes decreases clustering of *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1140-46
13. Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, Bubschoten A, van Embden J, Gicquel B. Evauation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1997;35:2210-14.
14. Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valway S,

Onorato IM, Castro KG, et al. interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. J Infect Dis 1997;175:1446-52.

15. Niemann S, Rusch-Gerdes S, Richter E. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Germany during 1995. J Clin Microbiol 1997;35:3015-20.*