

Rapid Typing of Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by IS6110-based Outward PCR

Yeun Kim¹, Uen-Ho Lee¹, Young-Kil Park², Gill-Han Bai², Sang-Nae Cho³
and Hyeyoung Lee^{4†}

¹Department of Life Science, College of Liberal Arts and Science; ⁴Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, 234 Maeji-ri, Heungup-myun, Wonju-si, Kangwon-do, 220-710;

²Department of Microbiology, Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, 14 Woomyun-dong, Seocho-gu, Seoul 137-140; ³Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seoul 120-752, Korea

Worldwide, tuberculosis remains one of the leading infectious diseases, accounting for nearly 3 million deaths and more than 8 million new cases annually. DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* is important for the control of tuberculosis, since it can be used to track transmission route of tuberculosis, source of internal laboratory contaminations, and to answer questions on the nature of tuberculosis infections such as reactivation or exogenous reinfection of disease. At present, IS6110-based RFLP is the choice of method for typing large numbers of clinical isolates of *M. tuberculosis*, since it has the highest resolution power. However, RFLP requires long time, high cost and qualified experts, so only reference level laboratories can use the RFLP technique. In order to have an optional molecular typing method suitable for the clinical settings, this study evaluated the use of one of PCR-based typing methods, IS6110-based outward PCR for typing clinical isolates of *M. tuberculosis*. In brief, the results from this study showed that IS6110-based RFLP is useful to discriminate diverse clinical isolates of *M. tuberculosis* as well as to identify clinical isolates that belong to the same family or cluster groups that have been previously classified by RFLP analysis. In addition, the banding profiles resulted from IS6110-based outward PCR seemed to represent genomic characteristics of *M. tuberculosis*, since strains belong to the K-family generated unique band that is not present in any other strains but present only in the genome of K-family strains. The IS6110-based outward PCR was also shown to be useful with DNAs isolated directly from liquid cultures indicating this method can be suitable for typing *M. tuberculosis* in clinical settings.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, DNA typing, PCR

서 론

1993년 세계보건기구 (The World Health Organization; WHO)가 결핵문제를 'global emergency'로 선포하였을 만큼 결핵은 아직도 전 세계적인 보건문제이다¹⁾. WHO의 발표에 의하면, 전세계 인구의 1/3이 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis*에 감염되어 있으며 매년 8백만 명의 새로운 환자가 발생하고 매년 3백만 명이 결핵으로 인해 사망한다고 한다^{3,4)}. 전세계 결핵 환자의 95%는 개발도상국에서 발생하고 있으나,

여행객의 증가 등 세계화의 영향으로 결핵은 비단 후진국만의 문제가 아닌 전세계의 보건문제로 대두되고 있다. 특히 acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) 환자들이 결핵으로 사망함에 따라 AIDS의 확산과 함께 결핵도 증가하는 추세에 있으며, 두 가지 이상의 항결핵 약제에 대해 내성을 갖는 다제내성결핵균에 의한 결핵이 증가함에 따라 그 심각성 또한 증가하고 있는 실정이다. 따라서 결핵 환자의 조기 발견과 적절한 처방에 의한 환자치료율 제고가 효과적인 결핵 감염경로의 차단에 매우 중요하다고 할 수 있다.

결핵감염의 효과적인 차단을 위해서는 결핵감염원의 신속한 파악이 매우 중요하다⁶⁾. 현재 결핵균의 typing 방법 가운데 표준방법으로 사용되고 있는 방법은 결핵균의 insertion element의 하나인 IS6110을 probe로 사용하는 제한효소절편 다형성분석법 (restriction fragment length polymorphism analysis: RFLP)이다^{5,11,16)}. 이 방법은 결핵균 유전체 DNA를 분리하고

*논문 접수: 2004년 4월 29일

수정재접수: 2004년 6월 2일

†별책 요청 저자: 이해영, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 매지리 234번지, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과
Tel: 033-760-2740, Fax: 033-760-2195
e-mail: hylee@dragon.yonsei.ac.kr

이 DNA를 이용하여 Southern blot hybridization을 시행하는 방법이다. 이 방법은 순도가 높은 많은 양의 결핵균 유전체 DNA를 필요하므로 결핵균을 배양해야 하는데 결핵균 배양은 3주 내지 4주 이상의 시간이 소요되는 한편, genomic DNA 분리로부터의 전과정을 마치는데 상당한 시간과 노력 및 숙련된 기술력이 필요하기 때문에 번거로운 면이 있다²⁾. 그럼에도 불구하고 결핵균을 다양하게 분류할 수 있어 표준 실험실 (reference laboratory) 및 연구소 등을 중심으로 가장 많이 사용되고 있는 방법이다.

그러나 임상에서 분리된 소량의 검체를 대상으로 감염원 확인 등의 목적으로 신속하게 결핵균을 분류하고자 하는 목적에는 RFLP가 적합하지 않다고 할 수 있다. 이와 같은 이유로 적은 양의 검체로도 균 분류가 가능한 다양한 종류의 PCR-based 결핵균 분류법이 제시된 바 있다^{7,9,10,13,17,18,19)}. 그러나 대부분의 방법이 IS6110-based RFLP에 비해 다양한 결핵균을 분류하기에 적합하지 않은 해상도 (discrimination power)를 가지므로 임상에서 실용적으로 사용되지 못하고 있는 형편이다.

반면, PCR-based 방법 가운데 IS6110-based outward PCR¹⁴⁾은 IS6110 element와 IS6110 element 사이의 DNA 부위를 증폭하는 PCR 방법으로 이 방법은 다양한 결핵균주마다 IS6110 element가 다양한 위치와 다양한 copy 수 존재한다는 점을 이용한다는 점에서 IS6110-based RFLP와 유사한 면이 있다. 그러나, IS6110-based RFLP에 비해 배양된 균주가 필요하지 않으며 방법이 간단하여 쉽게 빨리 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 더불어, 여타 PCR-based 방법에 비해 균 분류의 폭이 넓을 뿐 아니라 결과가 재현성이 있으며 균주에 따라 보이는 특정한 PCR 양상을 data-base화 할 수 있어¹²⁾ 집단발생 등의 추적 및 특정 균주의 경로 추적 등 용도에 매우 적합한 방법으로 생각된다.

본 연구에서는 IS6110-based outward PCR을 이용하여 임상에서 분리된 다양한 결핵균주의 분류를 시도하고 그 결과를 IS6110-based RFLP 결과와 비교하여 IS6110-based outward PCR의 임상검사에서 유용성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

*M. tuberculosis*의 표준균주인 H37Rv와 H37Ra를 포함하여, 실험실 균주로 Erdman을 사용하였다. 임상분리 균주들은 미국에서 임상분리된 CDC1551, HN878과 한국에서 임상분리된 균주들을 사용하였다. 실험에 사용된 균주들은 MB/BacT (Organon Teknica, NC, USA)에서 액체배지로 1주간 배양되거나, Ogawa 배지에서 3주간 배양되었다.

2. DNA 추출

RFLP 분석을 위한 결핵균 DNA는 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)을 사용한 방법에 의해 준비되었다⁵⁾. CTAB은 Low ionic strength 조건 하에서는 핵산과 결합하지만, 높은 이온 농도 조건 하에서 단백질과 대부분의 polysaccharide와 결합하여 침전되므로, *Mycobacteria*처럼 polysaccharide를 많이 함유하고 있는 세균에서 핵산을 분리할 때 유리하다. Ogawa 배지에서 3주 동안 배양한 균을 loop로 떠서 400 µl의 Tris-EDTA, pH 8.0에 잘 풀어 준 후 80°C에서 20분 이상 살균하였다. Lysozyme (10 mg/ml)을 50 µl 첨가하여 37°C에서 overnight 반응시켰다. 75 µl의 SDS/Proteinase K를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시킨 후, 5 M NaCl 100 µl, CTAB-NaCl (50 µl of 5 M NaCl and 40 µl of 10% CTAB) 100 µl을 첨가하여 vortex한 후, 역시 65°C에서 10분간 반응시켰다. 동일한 양의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1 [vol/vol]; 750 µl)을 넣어 잘 섞어준 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액만 새로운 1.5 ml tube에 옮겼다. Isopropanol 450 µl을 넣고 조심스럽게 섞어주고, -20°C에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 70% EtOH로 닦아낸 후 건조시킨 DNA는 50 µl Tris-EDTA, pH 8.0에 녹였다.

PCR 분석을 위한 액체배지에서 배양된 임상 환자의 결핵균 DNA의 추출을 위하여 양성으로 판정된 액체배지를 400 µl 취하여 1.5 ml microtube에 옮겼다. 100°C에서 4분 30초간 끓여준 후, 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액 5~10 µl를 PCR에 사용하였다.

3. RFLP

DNA 추출은 참고논문¹⁵⁾에 있는 방법대로 다음과 같은 방법으로 시행하였다¹⁵⁾. 추출된 DNA 약 4.5 µg를 제한효소 *PvuII*를 이용하여 37°C에서 2시간 이상 반응시켜 완전히 절단시켰다. 0.5 µg/ml EtBr, 0.8% TBE gel에 절단한 DNA를 점적하여 처음 10분간은 3.2 V/cm²으로 전기영동한 후, 0.8 V/cm²으로 전압을 낮추어 주고 밤새 전기영동하였다. 2 Kb 밴드가 약 8 cm에 올 때까지 전기영동하여 준 후 gel을 UV에 5분간 조사하였다. UV에 조사시킨 gel은 0.25 M HCl에 10분간 담근 후, DNA의 해리를 위하여 0.4 M NaOH에 20분간 2번씩 담궈 놓았다. 증류수로 헹궈낸 gel은 Hybond N⁺ charged membrane (Amersham Bioscience, UK)에 vacuum transfer를 이용하여 transfer하였다.

DNA를 옮긴 membrane은 UV-cross linking으로 membrane에 DNA를 고정시켰다. IS6110으로부터 증폭한 PCR 산물을 ECL-kit (non-radio labelling system; Amersham Bioscience, UK)로 labelling하여, prehybridization시킨 membrane에 넣어주고 밤새 반응시켰다. 42°C에서 primary wash buffer (6 M urea,

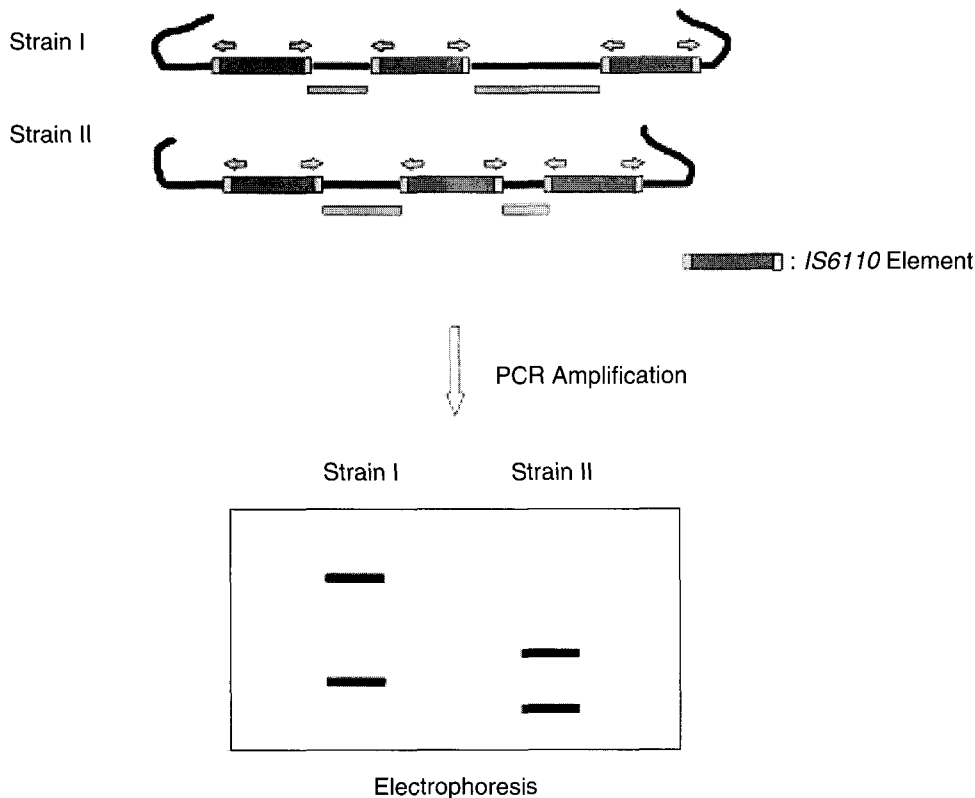


Fig. 1. Description of the principle of *IS6110*-based outward PCR. Outward primers (arrows) derived from the repeated sequences present in termini of *IS6110* amplify various in-between regions of two *IS6110* elements dispersed in the genome of *M. tuberculosis* by PCR. Subsequent electrophoresis of the PCR products reveal diverse DNA fragments that will show the differences of the strains.

0.004% SDS, 0.5X SSC)로 20분간 2번씩 닦아낸 후, 실온에서 2X SSC로 5분간 2번씩 닦아내었다. Detection solution 1과 2를 동량 섞어준 후 membrane에 부어 1분간 반응시킨 후 암실에서 Hyper film-ECL (Amersham Bioscience, UK)에 감광시키고 현상하였다.

4. *IS6110*-based outward PCR typing

IS6110-based outward PCR은 PCR typing 방법의 하나로 본 실험에서는 Ota et al.¹²⁾ 등의 방법에 따라 시행하였으며 그 원리는 Fig. 1에 나와 있는 바와 같다. PCR은 PCR Accu-Power premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였다. 사용된 primer는 *IS6110* IR (GACIIICCGGGGCGGTTC)으로, 20 µl 반응에 primer 20 pmol씩과 주형이 되는 genomic DNA를 100 ng씩 넣어주었다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 방치하여, DNA를 완전히 해리시킨 후 94°C 30초, 58°C 1분, 72°C에서 2분간씩 35주기를 수행하였다. 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켜 혹시 남아 있을지 모르는 미완성으로 남아 있는 DNA를 완전히 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 0.8% TBE gel에 전기영동한 후, EtBr로 염색하고 UV에 조사하여 관찰하였다.

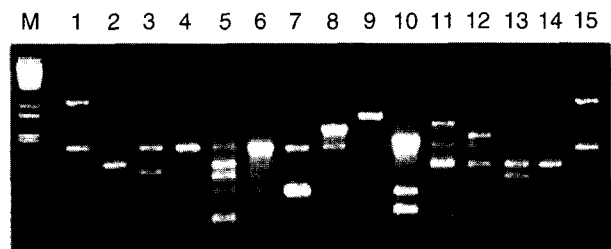


Fig. 2. Typical results of *IS6110*-based outward PCR with clinical isolates of *M. tuberculosis*. M; DNA size marker, *λ*Hind III, lanes 1-15; clinical isolates of *M. tuberculosis* isolated from Korean tuberculosis patients.

결 과

임상에서 분리된 결핵균주를 대상으로 *IS6110*-based outward PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 다양한 PCR 산물이 증폭되어 서로 다른 균주임을 구분할 수 있었다. 특히 Fig. 2의 lane 1과 lane 15, lane 2와 lane 14와 같이 서로 같은 양상의 PCR 결과를 보이는 균주들이 있어 이들 균주가 서로 같은 type의 균주인 것으로 보였다. *IS6110*-based

outward PCR에 의해 같은 균주로 확인되는 균주가 실제로 RFLP 양상이 같은 균주인지를 확인하기 위해 결핵균주 typing 방법 가운데 표준법으로 사용되는 IS6110-based RFLP를 이용하여 다양한 결핵균주의 typing을 실시하고 이어 같은 균주를 대상으로 IS6110-based outward PCR을 실시하였다 (Fig. 3과 Fig. 4).

실험에 사용된 균주는 결핵균 표준균주로 사용되는 H37Rv와 H37Ra를 포함하여 미국에서 일어난 결핵 집단발생사례에서 분리된 균주인 CDC1551과 HN878, 그리고 한국에서 분리된 다양한 임상분리 결핵균주이었다. 한국에서 분리된 임상분리 결핵균주 가운데 K 균주는 고등학교에서 발생한 결핵 집단발생사례에서 분리된 바 있는 균주이며⁸⁾ 결핵연구원이 전국에서 분리된 임상결핵균주를 대상으로 실시한

RFLP 결과에 의하면 여타 임상분리 결핵균주에 비해 그 분리 빈도가 가장 높은 속칭 dominant 균주라 일컬어지는 균주이다. 한편, A, B, C, D, 균주 등은 K 균주보다는 낮은 빈도로 분리되나 발생 예가 종종 있어 cluster 균주로 분류되는 균주이며, a, b, c, d 균주 등은 결핵연구원의 RFLP 분석 결과 한번 씩만 분리된 사례가 있어 unique 균주로 일컬어지는 균주 가운데서 선택된 균주이었다.

Fig. 3에서 볼 수 있듯이 각 균주의 IS6110-based RFLP 양상이 서로 다른 것을 볼 수 있다. 이들 균주들의 DNA를 사용하여 IS6110-based outward PCR을 시행한 결과, Fig. 4에서

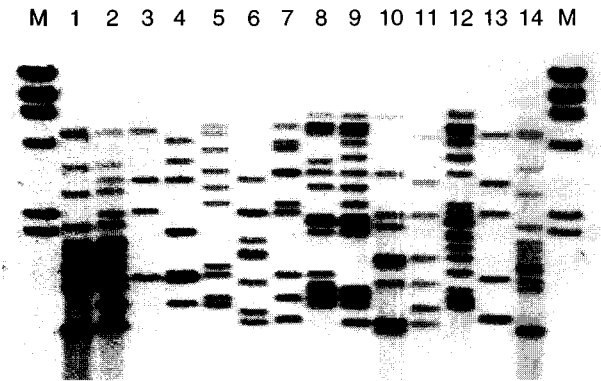


Fig. 3. Results of IS6110-based RFLP with various clinical isolates of *M. tuberculosis*. M; DNA size marker, λ Hind III, lane 1; H37Rv, lane 2; H37Ra, lane 3; Erdman, lane 4; CDC1551, lane 5; K strain, lane 6; A strain, lane 7; B strain, lane 8; C strain, lane 9; D strain, lane 10; a strain, lane 11; b strain, lane 12; c strain, lane 13; d strain, lane 14; H37Rv.

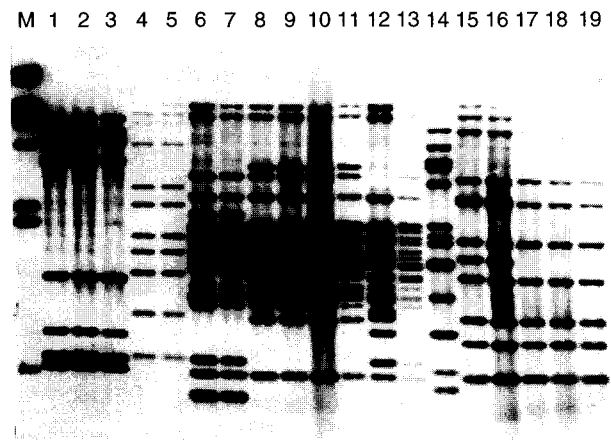


Fig. 5. IS6110-based RFLP profiles of clinical isolates of *M. tuberculosis* that are grouped as certain families based on isolation frequencies from Korean tuberculosis patients. (A) M; DNA size marker, λ Hind III DNA, lanes 1-3; clinical isolates of *M. tuberculosis* classified as A cluster strains, lanes 4 and 5; B cluster strains, lanes 6 and 7; D cluster strains, lanes 8-11; F strains, lane 12; C cluster strain, lanes 13; E cluster strain, lane 14; H37Rv, lanes 15-19; K-family strains.

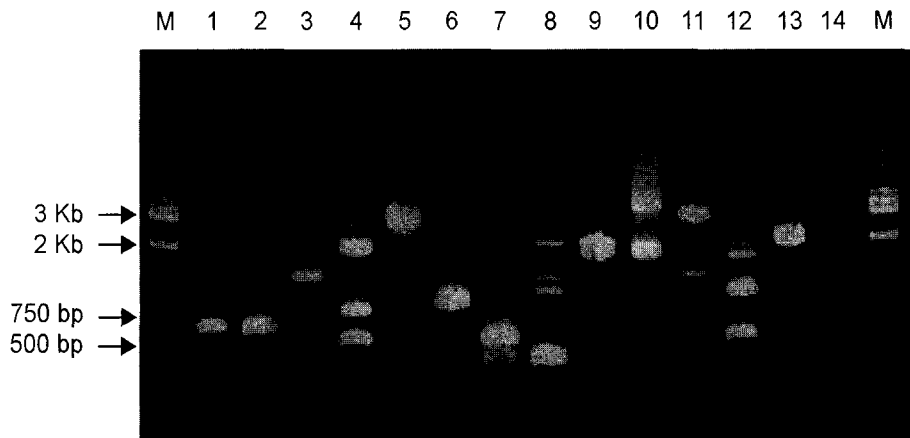


Fig. 4. Results of IS6110-based outward PCR with various clinical isolates of *M. tuberculosis*. M; DNA size marker, 1 Kb ladder, lane 1; H37Rv, lane 2; Erdman, lane 3; CDC1551, lane 4; HN878, lane 5; K strain, lane 6; A strain, lane 7; B strain, lane 8; C strain, lane 9; D strain, lane 10; a strain, lane 11; b strain, lane 12; c strain, lane 13; d strain, lane 14; PCR negative control.

볼 수 있듯이 각 균주의 *IS6110*-based outward PCR의 양상도 서로 상당히 다른 것을 볼 수 있었다. 즉 서로 다른 RFLP 양상을 가진 균주는 서로 다른 PCR 양상을 보여 *IS6110* based outward PCR에 의해 각각의 균주를 구분할 수 있음을 알 수 있었다.

이어 *IS6110*-based outward PCR법의 재현성을 확인하기 위해 같은 RFLP 양상을 가진 균주들을 대상으로 (Fig. 5) *IS6110*-based outward PCR의 양상도 동일하게 나타나는지를 알아보기로 하였다. 이를 위해 RFLP 양상에 따라 K-family 및 cluster 균주로 분리된 바 있는 여러 균주들을 대상으로 선정하여 우선 *IS6110*-based RFLP를 시행하였다. 그리고 이어 K-family 및 각각의 cluster에 속하는 임상분리 결핵균주 여러 주를 대상으로 *IS6110*-based outward PCR을 시행하고 그 결과를 비교하였다 (Fig. 6).

Fig. 6에서 보듯이 각각의 cluster에 속하는 균주들의

IS6110-based outward PCR의 양상은 동일한 것을 알 수 있었다. 즉 A cluster에 속하는 4개의 균주 모두가 동일한 PCR 양상을 보였듯이 (Fig. 6A, lane 1-4) 같은 cluster에 속하는 균주들은 모두 동일한 PCR 양상을 보임을 알 수 있었다. 또한, 한국에서 분리된 임상분리 결핵균주 가운데 가장 높은 빈도로 분리되는 K-family 균주들을 대상으로 *IS6110*-based outward PCR을 시행한 결과, K-family에 속하는 균주 모두 동일한 PCR 양상을 보였다 (Fig. 6B). 반면, 각각의 cluster에 속하는 균주들의 PCR 양상은 Fig. 4에서 본 결과와 마찬가지로 각각 독특한 profile을 가짐을 볼 수 있어 *IS6110*-based outward PCR 결과에 의해 균주들을 쉽게 분류할 수 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6A, B).

IS6110-based outward PCR이 각 균주의 특성으로 균주의 다양성을 나타낼 수 있음을 확인하였으므로 교체배지를 이용해 분리 배양한 결핵균주가 아닌 액체배지로 부터 간단

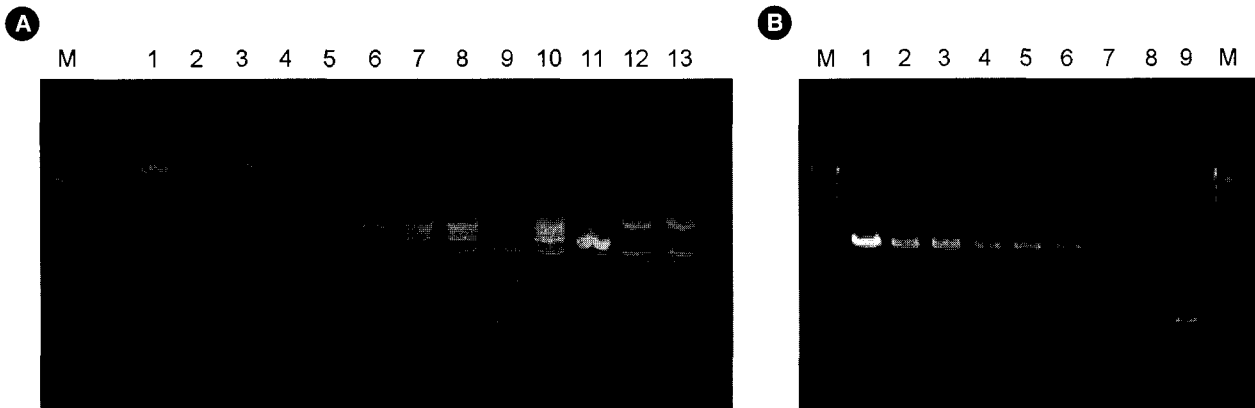


Fig. 6. Results of *IS6110*-based outward PCR with clinical isolates of *M. tuberculosis* belonging to certain families previously classified based on isolation frequencies among Korean tuberculosis cases. (A) M; DNA size marker, 100 bp ladder, lanes 1-4; clinical isolates of *M. tuberculosis* classified by RFLP profiles as A cluster strains, lanes 5 and 6; B cluster strains, lanes 7 and 8; C cluster strains, lane 9; D strain, lanes 10 and 11; E cluster strains, lanes 12 and 13; F cluster strains. (B) M; DNA size marker, 100 bp ladder, lanes 1-7; clinical isolates of *M. tuberculosis* classified as K-families by RFLP profiles, lane 8; A cluster strain, lane 9; H37Rv.

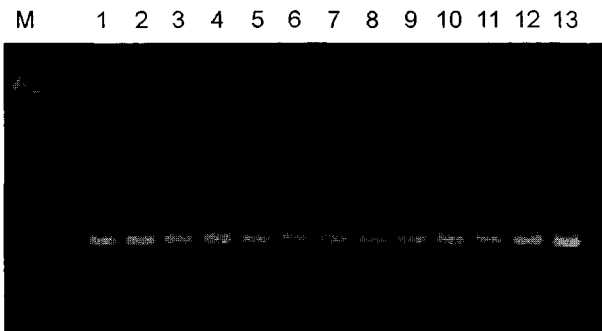


Fig. 7. Results of PCR using primers specific to K family of *M. tuberculosis*. M; DNA size marker, 100 bp ladder, lanes 1-13; clinical isolates of *M. tuberculosis* classified by RFLP profiles as K-family.

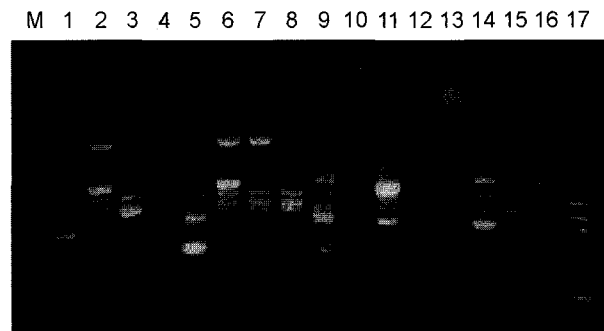


Fig. 8. Results of *IS6110*-based outward PCR using DNAs isolated directly from MB/BacT liquid culture system. M; DNA size marker, 100 bp ladder, lanes 1-17; clinical isolates of *M. tuberculosis* grown on MB/BacT liquid culture system.

한 방법으로 분리한 DNA를 이용하여 *IS6110*-based outward PCR을 시행하였다. Fig. 8에서 볼 수 있듯이 고체배지를 이용하여 분리 배양한 균주로부터 분리한 DNA가 아니더라도 PCR 산물의 profile을 통해 결핵균주의 구분이 가능한 것을 볼 수 있었다. *IS6110*-based RFLP의 turn-around time이 1주일 인 것과 비교할 때 *IS6110*-based outward PCR의 turn-around time은 1일이었다. 따라서 *IS6110*-based outward PCR이 액체 배지에서 배양된 배양액 등의 임상검체에 직접 사용하기에 매우 신속하고도 유용한 typing 방법이 될 수 있을 것으로 보였다.

고 찰

결핵균주의 typing은 특정 균주의 역학적 특성을 파악하기 위한 목적이나 특정 균주의 생물학적 특성을 밝혀내기 위한 목적, 혹은 특정 결핵의 감염경로 및 감염특성, 즉 재발결핵 인지 재감염에 의한 결핵인지의 여부 등을 알아내기 위해서, 또한 실험실내 감염원의 색출 및 결핵의 집단발생 추적 등을 목적으로 주로 사용된다. 결핵균의 typing을 위해 사용되고 있는 방법 중에 *IS6110*-based RFLP^{5,11,16}가 가장 균변별력이 높으므로 많은 수의 결핵균을 typing하고 분류하는데 가장 유용하게 많이 사용되고 있다.

그러나 *IS6110*-based RFLP는 많은 양의 질 좋은 유전체 DNA가 필요한 기술이므로 결핵균의 배양이 필수적이다. 그런데 결핵균의 배양에는 최소 3~4주가 소요된다. 게다가 결핵균 DNA의 분리로부터 RFLP 양상을 얻기 위해 수행되어야 하는 Southern blot hybridization도 숙련된 기술이 필요한 방법으로 제한효소 절단에서 전기영동을 거쳐 DNA의 이동 (transfer)과 표지자의 결합에서 시그날의 감지까지 걸리는 시간과 비용도 매우 높다.

따라서 *IS6110*-based RFLP는 표준실험실 (reference laboratory)에서 역학적 추적의 목적으로 시행하여 많은 수의 결핵균에 대한 database를 확보하는 목적에는 적합한 방법이나 집단발생의 추적, 혹은 특정 결핵균의 감염경로 파악 등과 같이 특정 균주에 대한 신속한 typing 결과가 필요한 목적에는 적합하지 않은 면이 있다. 따라서 신속한 typing에 사용하기 위해 다양한 종류의 PCR-based 방법들이 개발된 바 있다. 그러나 그 가운데 가장 결핵균의 균주변별력이 높은 방법이 *IS6110*-based outward PCR이다.

본 연구에서 RFLP 결과를 기준으로 서로 다른 균주로 분류된 결핵균주로 *IS6110*-based outward PCR을 수행하면 이들 균주가 서로 독특한 PCR 결과를 보여 이 PCR 결과를 기준으로 서로 다른 균주로 분류하는데 어려움이 없었다. 더욱이 같은 RFLP 양상을 갖는 균주들을 대상으로 수행한 *IS6110*-based outward PCR의 결과를 보아도 각 균주의

IS6110-based outward PCR 양상이 동일하여 같은 그룹에 속하는 균주인지, 혹은 같은 균주인지의 여부를 확인하는데도 유용하였다. 따라서 장시간의 시간을 요하는 RFLP 대신 *IS6110*-based outward PCR을 수행하여 RFLP에서 얻을 수 있는 같은 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

또한 한국에서 가장 많이 분리되는 것으로 밝혀진 균주인 K-family 균주를 대상으로 실시한 *IS6110*-based outward PCR 결과에서는 K-family 균주 특이 *IS6110*-based outward PCR 양상이 나타났으며 이 양상이 결국 K-family에만 존재하는 유전체 DNA의 구조에 기인한 것으로 확인되었다. 따라서 *IS6110*-based outward PCR에서 얻어진 특정 결핵균주-특이 밴드 양상이 그 특정 결핵균주의 유전체 특성을 나타내는 것임을 알 수 있었다. 이와 같은 특성을 이용하여 특정 결핵균주가 어떤 집단 내에 존재하는 빈도를 측정한다거나 하는 목적으로 *IS6110*-based outward PCR을 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 즉, 한국에서 가장 많이 분리되는 것으로 밝혀진 바 있는 K-family 균주의 분리빈도를 알아내기 위한 목적으로 전체 결핵균주를 대상으로 RFLP를 시행하는 대신 K-특이 *IS6110*-based outward PCR 양상을 갖는 결핵균의 분리빈도를 측정하게 되면 RFLP를 시행하는 것과 동일한 결과를 얻을 수 있으면서도 비용 및 시간 등이 현저히 줄어들게 될 것으로 생각된다. 향후 K-family 균주의 분리빈도 추적 등의 연구에 본 연구 결과를 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

한편, PCR-based 균주 typing법의 최대의 장점은 결핵균 배양과 배양된 결핵균으로부터 양질의 DNA를 많은 양 분리하는 데 걸리는 시간을 단축할 수 있다는 점이다. 따라서 액체배지에서 얻은 DNA를 대상으로 직접 결핵균의 typing이 가능한지를 확인하였으며 그 결과 *IS6110*-based outward PCR이 액체배지 등의 검체에 있는 결핵균을 신속하게 typing할 수 있는 방법임을 확인하였다. 이와 같은 실험 결과는 *IS6110*-based outward PCR 방법을 이용하여 임상검체를 대상으로 직접 특정 결핵균주의 typing을 실시할 수 있음을 보여 주므로 향후 객담 등의 검체를 대상으로 *IS6110*-based outward PCR을 수행할 수 있는지 등의 여부에 관해 연구해 보아야 할 것으로 생각된다. *IS6110*-based outward PCR이 신속하게 결핵균을 typing할 수 있는 방법이면서도 그 균변별력이 매우 높았으므로, 향후 이 방법은 일정 집단 내에서의 결핵집단발생 추적 조사나 접촉자 전염경로 추적 조사 등에도 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 집단발생 추적 조사나 접촉자 전염경로 추적 조사 등을 신속하게 완료할 수 있게 되면 전염경로의 효과적인 차단이 가능할 것으로 궁극적으로 결핵 관리에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Anonymous (2002): Global tuberculosis control report. P.6 WHO Geneva, Switzerland.
- 2) Braden C, Crawford JT and Schable BA (2002): Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emerg Infect Dis*, **8**: 1210-1215.
- 3) Dolin PJ, Raviglione MC and Kochi A (1994): Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull WHO*, **72**: 213-220.
- 4) Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC (1999): Global burden of tuberculosis; estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*, **282**: 677-686.
- 5) Van Embden JD, Cave AMD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Jermans P, Martin C, McAdam R and Shinnick TM (1993): Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, **31**: 406-409.
- 6) French AL, Welbel SF, Dietrich SE, Noshier IB, Breall PS, Paul WS, Kocka FE and Weinstein RA (1998): Use of DNA fingerprinting to assess tuberculosis infection control. *Ann Intern Med*, **129**: 856-861.
- 7) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper Bunschoten SA, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M and van Embden J (1997): Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, **35**: 907-914.
- 8) Kim SJ, Bai GH, Lee H, Kim HJ, Lew WJ, Park YK and Kim Y (2001): Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among high school students in Korea. *Int J Tuberc Lung Dis*, **5**: 824-830.
- 9) Magdalena J, Vachee A, Supply P and Locht C (1998): Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, **36**: 937-943.
- 10) Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C and Supply P (2001): High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 1901-1906.
- 11) Olive DM and Bean P (1999): Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, **37**: 1661-1669.
- 12) Otal I, Samper S, Asensio MP, Vitoria MA, Rubio MC, Gomez-Lus R and Martin C (1997): Use of a PCR method based on *IS6110* polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol*, **35**: 273-277.
- 13) Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A and Kunimoto D (1993): DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, **21**: 761-762.
- 14) Ross B and Dwyer B (1993): Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **31**: 329-334.
- 15) Ruiz Garcia M, Rodriguez JC, Navarro JF, Samper S, Martin C and Royo G (2002): Molecular epidemiology of tuberculosis in Elche, Spain: a 7-year study. *J Med Microbiol*, **51**: 273-277.
- 16) Samper, S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Lezcano MA, Vitoria LA, Rubio MC, Gomez-Lus R, Gomez L, Otal I and Martin C (1998): The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2**: 281-287.
- 17) Supply P, Nagdalena J, Himpensm S and Locht C (1997): Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol*, **26**: 991-1003.
- 18) Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B and Locht C (2000): Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*, **36**: 762-771.
- 19) Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D and Locht C (2001): Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*, **39**: 3563-3571.