

PCR-RFLP에 의한 대중목욕탕 내 Nontuberculous Mycobacteria의 동정

신흥대학 임상병리과¹, 동암의학연구소², 삼성서울병원 진단검사의학과³,
고려대학교병원 진단검사의학과⁴, 일산병원 병리과⁵

최 승 구¹ · 송 운 흥¹ · 강 치 환¹ · 조 규 봉¹ · 이 재 상² · 이 장 호³ · 김 성 일⁴ · 지 수 일⁵

Identification of Nontuberculous Mycobacteria Existing in Public Bathroom Water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

Seung-Gu Choi¹, Woon-Heung Song¹, Chee-Hwan Kang¹, Kyu-Bong Cho¹
Jae-Sang Lee², Jang-Ho Lee³, Sung-Il Kim⁴, and Soo-Il Jee⁵

Department of Clinical Laboratory Science, Shin Heung College, Uijeongbu 480-701, Korea¹,

DongAm Medical Institute, Seoul 122-833, Korea²,

Department Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea³,

Department of Laboratory medicine, Korea University Guro Hospital, Seoul 152-703, Korea⁴,

Department of Pathology, National Health Insurance Coporation Ilsan Hospital, Koyang 410-719, Korea⁵

Thirty two of bathroom water samples from public bathroom in Seoul areas were examined using acid-fast staining, Löwenstein-Jensen (L-J) medium culture and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). In 6.25% (2/32) bathroom water samples, acid-fast bacilli were detected by AFB stain, and in 21.9% (7/32) bathroom water samples, acid fast bacilli grew on L-J media. Of them, six acid-fast bacilli were identified as *Mycobacterium avium*, and the other AFB as *Mycobacterium szulgai* by PCR-RFLP. These results are suggested that accidental nontuberculosis mycobacterial infection to a weakness person will be possible in public area.

Key Words : Public bathroom water, Nontuberculous mycobacteria, PCR-RFLP

I. 서 론

과거 비정형 마이코박테리아(atypical mycobacteria)는 MOTT(mycobacteria other than tuberculosis)로 불리었으

며 최근에는 nontuberculous mycobacteria(이하 NTM)으로 지칭하고 있다. NTM은 토양과 하천 등 자연환경에 정상적으로 널리 분포하고 있으며 오염균 또는 집락균으로 간주 되어왔다. 그러나 1980년대 이후 미국과 유럽, 일본에서 후천성면역결핍증 등 면역기능 저하 환자에서의 결핵성 감염과 질환이 없는 정상면역 상태인 성인에서 NTM에 의한 폐질환의 발생이 증가되어 주목을 끌게 되었다(Falkinham, 1996). 병원 수도물에서 분리된 NTM은

교신저자 : 최승구, (우) 480-701 경기도 의정부시 호원동 117번지, 신흥대학 임상병리과
Tel : 031-870-3404, 011-422-3236,
E-mail: sgchoi3236@hanmail.net

면역결핍환자에서 폐질환을 유발한다는 사실이 증명되었으며 더욱이 NTM의 일부 종들은 시판되는 생수 및 자연 환경에서 동정되어 왔다(Caroli 등, 1985; Hillebrand-Haverkort 등, 1999).

수도물 및 자연환경(Covert 등, 1999; Argueta 등, 2000; Chang 등, 2002) 등에서 NTM이 동정됨으로써 사람이 많이 이용하는 대중 목욕탕 물과 같은 환경에서도 NTM이 존재할 수 있음을 유추할 수 있으며, 만약 NTM이 존재한다면 면역기능이 약화된 사람에게 폐질환 유발 가능성이 있다고 판단했다.

저자는 현재까지 발표된 사례는 없지만 대중이 이용하는 목욕탕 물에 NTM이 존재한다면 심각한 사회적 문제가 야기될 것으로 판단하고 목욕탕 물에 대한 NTM 존재유무를 조사하기로 결정하였다. 따라서 수도권 32개 대중목욕탕 물을 채수하여 조사했으며 NTM 검출을 위하여 acid-fast 염색, Löwenstein-Jensen(L-J) 배지에서의 배양 그리고 PCR-RFLP 방법을 이용하여 대중 목욕탕 물의 NTM 오염정도 및 오염 균종을 동정하였다.

II. 재료 및 방법

목욕탕 물 표본은 수도권 내 대중목욕탕 32곳에서 각각 200 mL씩 채수했다. 그 후 4,500 rpm, 30분 원심한 후 침전물은 4% NaOH로 20분 처리하여 acid-fast 염색, L-J 배지접종 그리고 직접 PCR 분석에 이용했다.

Acid-fast의 염색은 고전적인 Kinyoun 방법을 이용해서 수행했다(Koneman 등, 1997). Slide 는 98% ethanol로 깨끗이 닦은 후, 각 물 표본 10 μ L 적하시켜 건조 고정 후 염색을 했다.

L-J 배지 접종은 10 μ L 물 표본을 L-J 배지 위에 접종했으며(Difco, USA), 그 후 37°C에서 배양했다. 집락 생성유무는 6주 동안 매일 관찰하여 확인했다. 그리고 집락이 형성된 표본은 acid-fast 염색을 시행하였고, acid-fast 염색에서 양성으로 염색된 표본은 간접 PCR에 응용했다.

직접 PCR 증폭을 위하여 목욕탕 물 표본 10 μ L를 3000 rpm 에서 30분 동안 원심하여 상청액을 제거한 후, 침전물을 TE buffer 1 mL에 부유시켰다(Zwadyk 등, 1994). 간접 PCR 증폭을 위한 검체는 L-J 배지에 배양된

집락 1~2개를 멸균 loop를 이용하여 TE buffer 1 mL에 부유시켰다. TE buffer에 부유된 균액을 13,000 rpm에서 3분간 원심 분리하고 상청액을 제거한 후 DNA 추출액 50 μ L를 넣었다. 세계 진탕한 후, 100°C에서 20분간 가열하여 마이코박테리아의 DNA를 추출하였으며, 이를 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 분리된 상청액 5 μ L를 PCR에 이용했다.

마이코박테리아 신속 동정은 중합효소연쇄반응-제한절편길이다형성(PCR-RFLP)방법을 이용하였으며(Böddinghaus 등, 1990), Myco-ID[®] PCR-RFLP Assay kit(M&D, Korea)를 이용하였다. PCR 증폭 과정은 마이코박테리아의 RNA 중합효소 β -소단위를 코딩하는 *rpoB* 유전자의 일정부위(*rpoB* 유전자의 902~1261번 염기까지, 총 360 bp)를 다량 증폭시켰다. 증폭 과정에 사용된 primer set는 5'-TCAAGGAGAAGCGCTACGA-3'(RPO5') 그리고 5'-GGATGTTGATCAGGGTCTGC-3'(RPO3')을 이용하였다(Kim 등, 1999).

PCR 반응액 조성은 PCR premix(Bioneer, Korea)에 추출된 DNA 5 μ L와 8-MOP solution 18 μ L를 첨가하여 최종 50 μ L 반응액을 만들어 실험에 이용하였다. Thermal cycler의 반응조건은 94°C에서 5분간 반응시킨 후 변성(94°C에서 20초), 결합(58°C에서 20초), 신장(72°C에서 60초)반응을 45 cycle 시행한 후, 72°C에서 10분 동안 최종 신장반응을 시행하였다. PCR 반응산물의 결과 확인은 2% agarose gel을 준비하고, DNA size marker(20-bp ladder)와 PCR 반응산물 5 μ L를 150 volt에서 20분간 전기영동 하였다. Etidium bromide로 DNA를 염색하여 UV transilluminator에서 360 bp의 반응산물을 확인하였다(Telenti 등, 1993).

본 실험에서는 양성 대조로 *M. tuberculosis*를 사용하였고, 제한효소는 *Msp* I 과 *Hae*III를 이용하였으며, 제한효소 반응액은 PCR반응산물 15 μ L, 10x buffer 2 μ L, 멸균증류수 2.5 μ L의 혼합액에 *Msp* I (10 U/ μ L) 0.5 μ L와 *Hae*III(10 U/ μ L) 0.5 μ L를 각각의 반응액에 넣은 후 37°C thermal cycler에서 15시간 반응시켰다. 그 후 RFLP분석을 위하여 20 bp DNA size marker 10 μ L와 제한효소 반응산물 10 μ L를 4% Nusieve gel, 150 volt에서 35분간 전기영동 하였다. 결과는 UV transilluminator에서 restriction enzyme recognition site를 확인하고, 판독은 제조사에서

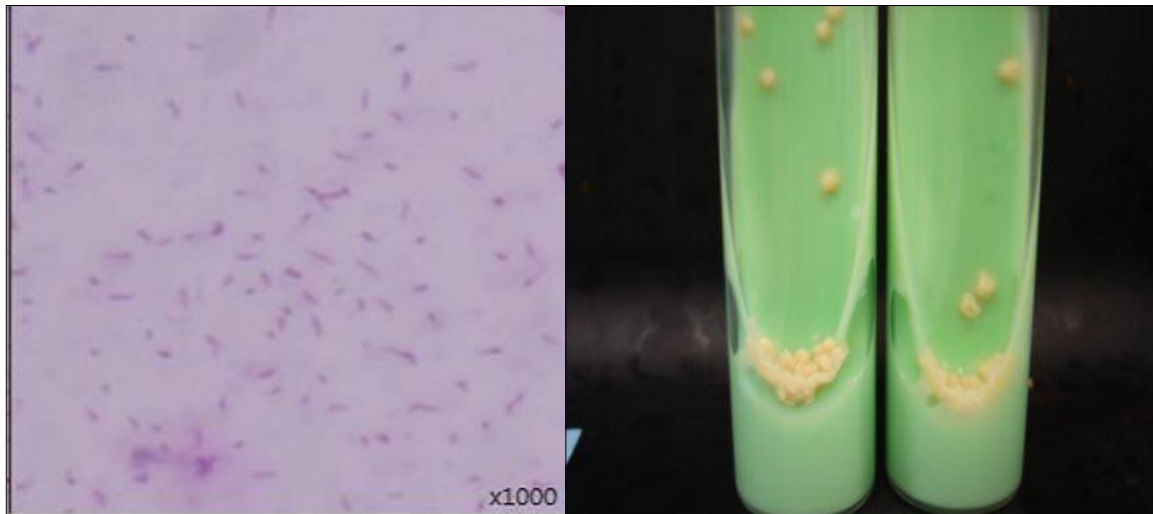


Fig. 1. Acid fast bacilli on acid-fast stain and colonies of *M. avium* on L-J medium isolated from public bathroom water.

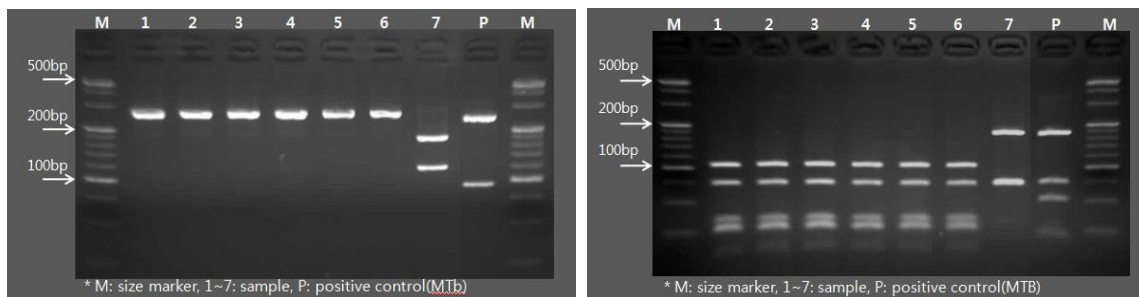
제시한 ‘마이코박테리아 및 노카디아 동정 알고리즘’을 참조하여 동정하였다.

III. 결 과

목욕탕 물에서의 NTM 존재를 증명하기 위하여 수도권 32곳의 공중 대중목욕탕에서 각각 물 표본을 채수하여 실험에 이용했다. Acid-fast 염색 결과는 32건의 표본 중 2건에서 양성을 보여 6.25% 양성률을 나타냈다.

농축 표본을 직접 PCR을 시행한 결과 32건 모든 표본에서 음성반응을 보였다. L-J배지에서의 배양은 7건의 표본에서 집락이 형성되어 나타났다. L-J배지에서 배양된 집락이 NTM인지 확인하기 위하여 배지에서 균 집락을 멸균된 loop로 각각 채취하여 acid-fast 염색과 간접 PCR-RFLP를 시행하였다. Acid-Fast 염색 결과 7건 모든 표본에서 양성반응을 보였다(Fig .1).

PCR-RFLP 결과는 우선 PCR 반응산물을 확인한 결과, 360 bp 대에 강한 반응산물을 확인한 7건의 표본, 21.9%에서 NTM을 함유하는 것으로 결론 내렸다.



A. *Msp* I digestion

B. *Hae*III digestion

Fig. 2. Result of PCR analysis on the products treated with restriction enzyme *Msp* I (A) and *Hae*III (B). Lanes M: 20 bps ladder DNA size marker. In side A and B, lane 1 to 6 were identified to *M. avium*, which contained 105 bps, 80 bps, 50 bps, 45 bps restriction fragments in A, and 270 bps in B, respectively. Lane 7 was identified to *M. szulgai* type, contained 175 bps, 80 bps by *Msp* I digestion, and 200 bps, 115 bps by *Hae*III digestion. Lane P as positive control, *M. tuberculosis*, was presented with 175 bps, 80 bps, 60 bps, and 40 bps fragments by *Msp* I digestion, and 250 bps, 100 bps fragments by *Hae*III digestion.

Telenti 등(1993)에 의한 연구에 따라 360 bp PCR 반응 산물을 가진 7건의 표본은 중 분류를 위하여 제한효소 *MspI*과 *HaeIII*에 반응시켜 NTM 종을 분석하였으며, 첫째, 제한효소 *Msp I*을 사용한 결과는 총 7건의 표본 중 6건에서 *M. avium*(105 bp, 80 bp, 50 bp, 45 bp), 그리고 1건에서 *M. szulgai* type(175 bp, 80 bp)로 동정되었다(Fig. 2A). 둘째, 제한효소 *HaeIII*을 사용한 결과는 총 7건의 표본 중 6건에서 *M. avium*(270 bp), 그리고 1건에서 *M. szulgai* type(200 bp, 115 bp)로 확인되었다(Fig. 2B).

IV. 고 찰

과거의 비정형 마이코박테리아는 일명 nontuberculous mycobacteria로 불리고 있다. NTM은 AIDS 환자를 비롯한 면역결핍환자에게 감염되어 결핵성 감염을 유발한다고 알려져 있다(Falkinham, 1996). NTM은 사람에서만 검출되는 것이 아니라 생수, 수도물 및 기타 환경에서도 발견될 수 있음이 밝혀지고 있으며 전 세계적으로 분포하고 있다(Falkinham, 1996; Chang 등, 2002). 따라서 위에서 언급했던 내용을 기초로 하여, 저자들은 대중이 이용하는 목욕탕 물에 NTM이 존재하는지 여부를 조사하기로 결정했으며 수도권 32개 목욕탕을 대상으로 채수를 시행했다. 그 후 AFB염색, L-J 배지에서의 배양 그리고 PCR을 이용하여 동정했다.

본 실험에서 목욕탕 물에서의 NTM 검출율은 21.9%로 나타났다. Chang 등(2002)은 수도물에서 20.4%의 검출율을 보였으며 Covert 등(1999)은 얼음 샘플에서 54%의 검출율과 시판되는 음용수에서 35%의 NTM 검출율을 나타냈다. Argueta 등(2000)은 음식물 샘플 121개 중 25개의 샘플에서 NTM 양성을 보여 20.6% 검출율을 보였다. 그러므로 우리의 목욕탕 물 표본에서 NTM의 검출율은 기타 다른 환경 내 NTM 검출율과 유사하거나 일부 차이를 보이고 있지만 자연환경 내에 NTM이 존재한다는 측면에서는 일치하였다.

목욕탕 물 표본의 배양에 의한 NTM 검출율은 21.9%이었다. 그러나 acid-fast 염색에서의 양성비율은 6.25% (2/32개)를 나타내어 15.65%의 차이를 나타냈다. AFB 염색에서의 양성반응과 실질적인 검출율 사이에서 15.65%

의 차이는 미량으로 존재하여 AFB염색에서 낮은 검출율을 보였다고 판단한다. 또한 이러한 결과는 환자의 객담검사에서의 AFB염색 및 배양검사 결과와 유사한 검출율을 보이고 있다(Falkinham, 1996).

PCR-RFLP방법에 의한 분석은 7개 양성 표본 중 *M. avium*과 *M. szulgai*의 NTM 2개 종이 동정되었으며 분리된 NTM 중에서 *M. avium*이 85.7%, *M. szulgai* 14.3%로 *M. avium*이 대다수를 보이고 있다. 반면 Chang 등(2002)은 *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. simiae*, *M. szulgai* 과 같이 7개 종을 분리하였으며 *M. avium*은 분리되지 않았다. 두 연구 사이에서 나타나는 종의 종류 차이점은 아마도 다른 환경에 표본의 노출과 관련이 있을 것으로 생각한다.

수도물 또는 기타 물 공급원에서 NTM의 오염은 면역결핍환자의 결핵성 감염 원인이 될 수 있다고 일반적으로 알려져 있으며 공중보건의 문제점으로 지적되고 있다. 또한 *M. avium*은 면역결핍환자에 있어서 결핵관련 질병을 유발시키는 중요한 균주로 증명되었다(Falkinham, 1996). NTM에 의하여 발생하는 병원내의 발병은 병원내 물 공급원의 오염과 관련된다고 보고되었다(Wallace 등, 1998). 더욱이 *M. avium*과 *M. szulgai*와 같은 일부 종들은 치과 내에서 cooling 물 표본과 스프레이 물 표본에서 동정되었다. 그러므로 물 공급원수는 결핵관련 질병을 예방하기 위하여 반드시 조사해야 한다고 하였다(Schulze-Röbbecke 등, 1995).

우리의 실험 결과는 대중 목욕탕 물에도 NTM이 오염돼 있음을 증명한 것으로 매우 중요하며 대중 목욕탕은 많은 사람이 이용하는 중요한 공공장소 이므로 보다 철저한 물 관리가 필요함을 암시한다. 그리고 목욕탕 물의 NTM 오염 원인을 좀더 정확하게 규명하기 위해서는 목욕탕 물 공급원수의 추가적인 조사가 중요하다.

참 고 문 헌

1. Argueta C, Yoder S, Holtzman AE, Aronson TW, Glover N, Berlin OG, Stelma GN Jr, Froman S, Tomasek P. Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from foods as possible expo-

- sure sources. *J Food Prot* 63:930-933, 2000.
2. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 28:1751-1759, 1990.
 3. Caroli G, Levre' E, Armani G, Biffi-Gentili S, Molinari G. Search for acid-fast bacilli in bottled mineral waters. *J Appl Bacteriol* 58:461-463, 1985.
 4. Chang CT, Wang LY, Liao CY, Huang SP. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 68:3159-3161, 2002.
 5. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN Jr. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 65:2492-2496, 1999.
 6. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9:177-215, 1996.
 7. Hillebrand-Haverkort ME, Kolk AH, Kox LF, Ten Velden JJ, Ten Veen JH. Generalized *Mycobacterium genavense* infection in HIV-infected patients: detection of the mycobacterium in hospital tap water. *Scand J infect Dis* 31:63-68, 1999.
 8. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol* 37:1714-1720, 1999.
 9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC (ed.). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. p893-952, Lippincott Williams & Wilkins, NY. 1997.
 10. Schulze-Röbbecke R, Feldmann C, Fischeder R, Janning B, Exner M, Wahl G. Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber Lung Dis* 76:318-323, 1995.
 11. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, 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.
 12. Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 52:453-490, 1998.
 13. Zwadyk P Jr, Down JA, Myers N, Dey MS. Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. *J Clin Microbiol* 32:2140-2146, 1994.