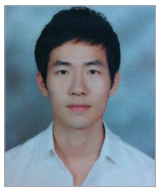
프랑스 파스퇴르연구소에서의 결핵진단 기술연수 후기



장 윤 호
농림축산검역본부 동식물위생연구부 세균질병과
인수공통전염병연구실 수의연구사
cllaric@korea.kr

파스퇴르 연구소는 1887년 미생물학자이자 화학자였던 루이스 파스퇴르에 의해 설립된 비영리 연구기관으로 교육, 연구 및 다양한 공중보건 사업을 통해 감염성 질병의 치료와 예방에 앞장서오고 있다. 프랑스 파리의 파스퇴르연구소에는 현재 Cell biology and Infection, Developmental biology, Structural biology and Chemistry, Genomes and Genetics, Immunology, Infection and Epidemiology, Microbiology, Neuroscience, Parasitology and Mycology, and Virology 총 10개의 division에 146개의 연구 unit이 있으며, 약 2,600여명의 연구 인력을 갖추고 있다. 본 연구소는 연간 약 30~40억 원의 연구예산으로 운영되고 있으며 WHO 및 다양한 국가와 연구 네트워크를 형성하고 있고, 세계적으로 유럽, 아프리카, 아시아, 아메리카, 오세아니아 5대륙 25개국에 총 32개의 연구소가 있다. 〈그림1〉

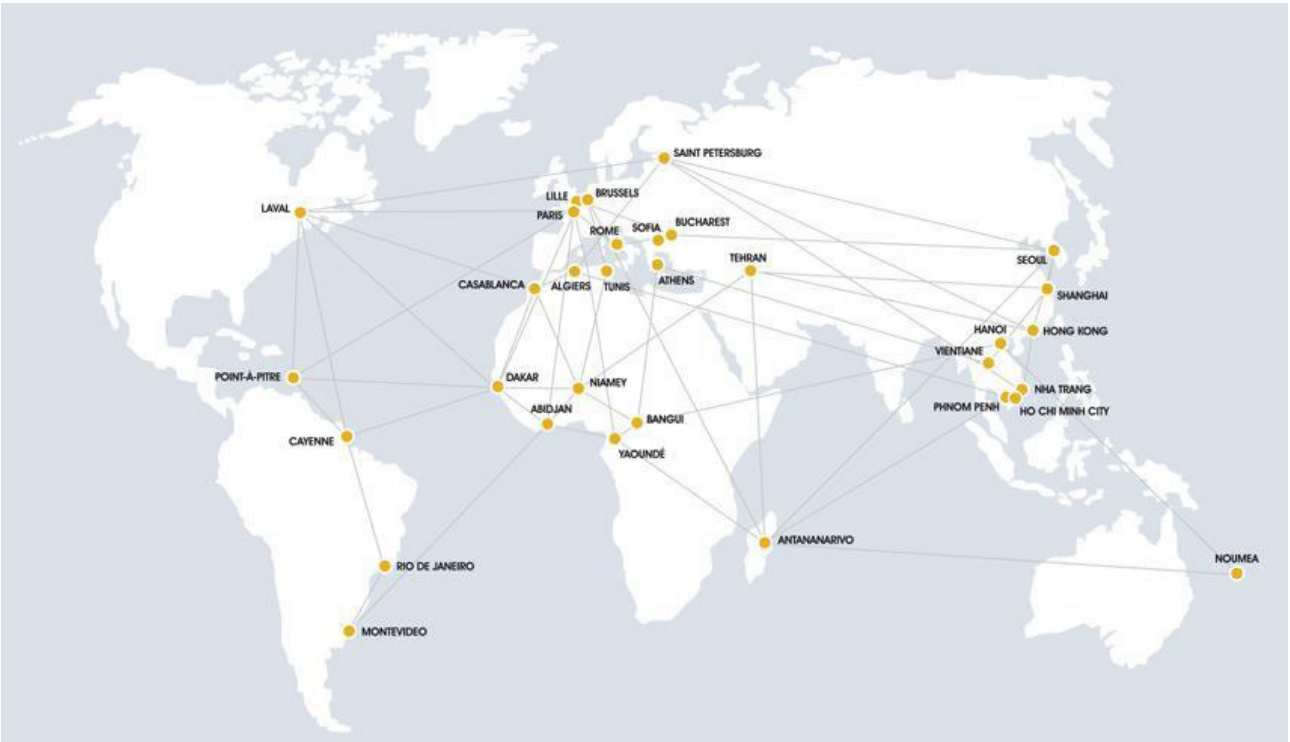


그림1. 파스퇴르연구소 분포현황(수)

유럽(8) : 파리, 브뤼셀, 로마, 아테네, 생트페테르부르크, 릴, 소피아(불가리아), 부쿠레슈티(루마니아)

아시아(9) : 서울, 홍콩, 상해, 프놈펜(캄보디아), 하노이, 호치민, 나트랑(베트남), 비엔티안(라오스), 테헤란(이란)

아메리카(5) : 몬테비데오(우루과이), 리우데자네이루, 카옌, 과델루프, 라발(캐나다)

아프리카(9) : 알제, 튀니스, 카사블랑카(모로코), 다카르(세네갈), 아비장(코트디부아르), 니아미(니제르), 방기(중앙아프리카공화국), 야운데(카메룬), 안타나나리보(마다가스카르)

오세아니아(1) : 누메아(뉴칼레도니아)

파스퇴르연구소에는 매년 다양한 나라로부터 250여명의 학생이 교육프로그램에 참가하고 있으며, 약 800여명의 훈련생이 다양한 연구실에서 기술훈련을 받고 있다. 이 외에도 20여개의 다양한 분야의 연수코스를 제공하고 있으며, 결핵진단을 위한 기술연수 코스도 이러한 연수코스 중의 하나로 20여명의 관련 연구자들을 대상으로 매년 최신 진단 기술의 이론과 실습 교육을 제공하고 있다. 본 연수과정은 인체감염 원인체인 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)에 대한 일반적인 내용 뿐만 아니라 진단법, 백신 개발 및 역학분석을 중점적으로 다루고 있었다. 따라서 농림축산검역본부 세균질병과에서 소 결핵병을 다루고 있는 필자에게는 본 연수과정을 통해 얻은 정보들을 인체결핵균과 유사성이 많은 *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)의 연구와 진단에 벤치마킹 할 수 있는 부분이 많을 것으로 판단되었다. 파스퇴르에서 진행하는 다양한 연수과정은 국내 관련분야의 연구자들에게 최신 관련 기술동향을 배울 수 있는 좋은 기회라 생각되며, 여기서는 올 여름 파리 파스퇴르연구소에서의 2주간 기술연수에서 다룬 내용들을 살펴보고자 한다.

1. 결핵의 역사와 발생현황

결핵균은 지구상에 오래전부터 존재해왔다. 약 17,000년 전 생존한 것으로 추정되는 북아메리카의 들소뼈에서 분리되었다는 보고가 있으며, 기원전 3,000년 전에도 남아메리카, 이집트 등에서 결핵병 발생의 흔적이 발견된 적 있다고 한다. 16~18세기를 지나오면서 결핵병에 대한 개념이 인식되었고, 19세기 독일의 미생물학자인 Robert koch가 처음으로 결핵균의 분리에 성공한 후, 20세기부터 BCG백신의 개발, 항결핵제제의 발견 및 임상에의 적용 등의 성과를 얻을 수 있었다. 사람결핵병의 환자는 세계적으로 약 870만 명 정도로 추정되고 있으며, 매년 140만 명이 결핵으로 사망하고 있다. 국내에서도 제3종 법정전염병으로 관리되고 있으나, 매년 약 4만 명의 환자가 발생하고 있으며, 결핵으로 인한 사망자도 인구 10만 명당 4.9명으로 높은 수준이다[1]. 사람결핵균과 소결핵균은 모두 사람과 동물에 감염가능한 인수공통전염병 원인체로, 소결핵균에 의한 사람감염은 국내에서는 보고되지 않고 있으며, 미국, 영국 등 일부국가에서 멸균 처리가 안 된 우유의 섭취나 수의사, 도축업 종사자, 농장주 등이 감염축과의 접촉을 통해 감염된 경우가 보고되고 있다[2]. 국내에서 소결핵병의 경우, 현재 제2종 가축전염병으로 관리되고 있으나, 소, 사슴 등에서 꾸준히 발생하고 있어 지속적인 방역정책을 실시하고 있는 상황이다. (표1)

표1. 최근 5년간 소결핵병 발생현황 ※두수(건수)

축종	2008	2009	2010	2011	2012
소	239(839)	257(1,194)	389(1,567)	444(1,687)	528(1,639)
사슴	18 (228)	74 (961)	196 (2,655)	103 (980)	49 (600)

2. 결핵의 치료와 백신

항결핵제제는 Streptomycin(1946)을 시작으로, Isoniazid (1951), Pyrazinamide(1952-1972), Ethambutol(1962), Rifampicin(1967) 등이 발견되어 대부분 현재 결핵병의 치료에도 이용되고 있다. 기본적으로 항생제 내성이 없는 결핵의 경우, 2개월간 Rifampicin+Isoniazid+Pyrazinamide+Ethambutol를 병행투여하고, 이 후 4개월간 Rifampicin+Isoniazid를 병행투여하는 것이 표준 단기화학요법으로 이용된다. 그러나 1차 내성(이전 결핵 치료이력 없이 내성균에 감염)이나 획득내성(장기간의 투여, 부작용 등에 의해 임의로 환자가 투여를 중단하거나 불규칙적인 복용하는 경우)에 의한 다재내성(Multidrug resistance,MDR)/광범위 내성(Extensive resistance, XDR) 결핵의 발생이 문제가 되고 있다. MDR은 Rifampicin과 Isoniazid에 모두 내성을 나타내는 것을 말하며, XDR은 MDR에서 추가적으로 fluoroquinolone계열 약제 1가지와 주사용 약제(Amikacin, Kanamycin, Capreomycin) 중 1가지에 내성을 나타내는 것을 말한다. MDR의 경우, WHO의 치료 가이드라인을 보면 "Fluoroquinolone 계열은 포함되어야하며, 가능한 뒷 세대의 약제가 좋다" "Etionamide나 Prothionamide도 포함되어야한다" "최소한 Pyrazinamide, 1종류의 Fluoroquinolone, 1종류의 주사용 약제, Ethionamide (또는 Prothionamide), Cycloceserine 또는 PAS(Para-Aminosalicylate Sodium)가 치료에 포함되는 것이 좋다" "치료기간은 이전에 MDR를 치료한 이력이 없는 환자에서 최소 20개월 이상 요구된다" 이렇게 언급하고 있다. XDR의 경우, MDR치료 가이드 라인에서 내성을 나타내는 항생제를 제외하고 가능하다면 다른 약물로 대체해서 장기간 투여를 실시해야한다. 그러나 조사결과에 따르면 MDR의 경우, 치료확률이 50~80%, XDR의 경우 약 30%정도 수준으로 치료에 실패하거나 재발하는 경우가 많아 문제가 되고 있는데 현재로서는 감수성결핵이나 MDR의 치료시 적절한 투여와 투여기간을 준수하여 MDR이나 XDR로의 재발을 막는 것이 가장 중요하다. (표2)

표2. MDR결핵을 위한 항결핵제제

1st Group (경구용)	Pyrazinamide(Z), Ethambutol(E)
2nd Group (주사용)	Kanamycin(Km), Capreomycin(Cm), Amikacin(Am), Viomycin(Vio)
3rd Group (플루오르퀴놀론계)	Moxifloxacin(Mfx), Ofloxacin(Ofx), Gatifloxacin(Gfx), Ciprofloxacin(Cfx), Levofloxacin(Lfx)
4th Group (2nd 경구용)	Ethionamide(Eto), Prothionamide(Pto), PAS, Cycloserine(CS)
5th Group (신종)	Clarithromycin(Clr), Linezolid(Lzd)

소결핵병은 사람결핵과 달리 따로 치료를 하는 경우는 거의 없다. 소결핵병 역시 사람결핵과 마찬가지로 6개월 이상 장기적인 항생제투여가 필요한데, 감염되어 있는 동안 결핵균을 배설하여 다른 동물로 확산가능성이 크기 때문에 국내뿐만 아니라 다른 나라에서도 거의 대부분 치료를 실시하지 않고 사전 검진 및 살처분을 통한 예방 및 전파방지에 중점을 두고 있다.

BCG(Bacillus Calmette Guerin)백신은 1908년 프랑스의 미생물학자인 Calmette과 수의사였던 Guerin에 의해 M.bovis의 약독화균주의 분리에 성공한 이후, 1921년부터 임상실험을 진행하여 2차 세계대전 이후 상용화되었다. 국가별로 BCG의 효과에 대해서는 의견이 다양하였으며(그림 2,[3]), 정책적인 도입에서도 차이가 있다(표3).

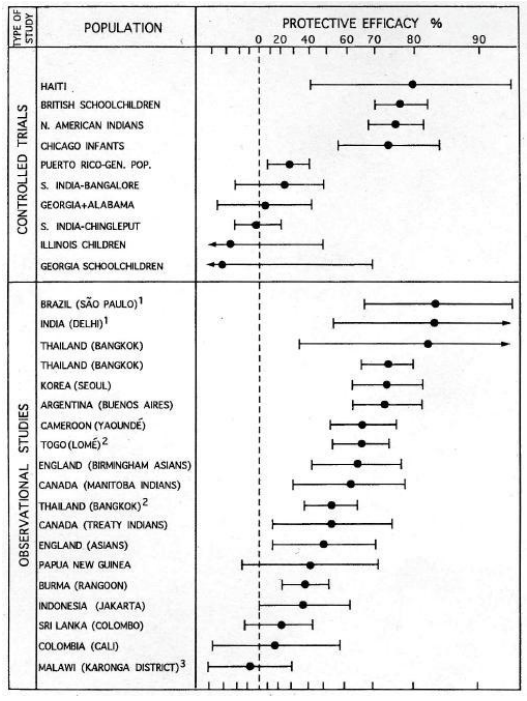


그림2. 다양한 국가에서의 BCG백신의 방어 효과 (1994)

표3. 국가별 BCG백신 정책

대한민국, 대만, 러시아, 말레이시아, 싱가포르	의무 접종
프랑스, 영국, 노르웨이, 브라질	고위험군에 대해 선택적 접종
미국	예방차원에서는 안함. 특수한 경우 실시

WHO에서는 결핵 발생율이 높은 지역의 모든 신생아와 결핵에 노출될 위험이 높은 지역의 유아에게는 BCG백신을 1회 접종하는 것을 추천하고 있는데 면역력이 떨어진 상태이거나, AIDS감염환자의 경우는 감염의 우려가 있어서 주의를 요하고 있다. 소결핵병에 대해서는 전세계적으로 상용화된 백신은 아직 없으며, BCG백신의 경우, 약독화된 M.bovis로 만든 백신이기 때문에, PPD항원을 이용한 단일피내검진에서 교차반응을 유발할 수 있고, BCG접종 전, 환경유래 마이코박테리아(Non-tuberculosis Material, NTM)에 감작되어 있으면 BCG의 예방효과가 떨어질 수 있어 사용에 적합하지 않다. 국내외에서 사람결핵과 마찬가지로 소결핵병에서도 다양한 백신개발 연구가 진행 중에 있다(표4,[4]).

표4. 다양한 소결핵병 백신의 특징

백신종류	백신효과
BCG (약독화백신)	방어효과는 있으나, PPD로 감염우와 백신우 구별이 불가하며, NTM감작시 효과 감소
Modified BCG	영양요구주 변화백신이나 특정 유전자 과발현 백신을 시도하였으며, 뚜렷한 성과 없었음.
M.bovis 사백신	체액성면역을 유도하며, 세포성면역 효과는 낮음.
Sub-unit백신	PPD에 영향 주지 않고, NTM감작여부에도 영향받지 않으나, 세포성면역 효과 감소
DNA백신	DNA백신자체로는 효과가 감소하며, BCG로 부스팅 시켰을 때, BCG백신 단독사용보다 효과 좋다는 보고 있음. 그러나 BCG의 단점인 PPD에 대한 간섭 및 NTM감작에 대한 단점은 그대로.

3. 결핵병의 진단

사람결핵의 진단은 주로 증상이 있는 환자가 내원했을 때 이뤄진다. 기침이나 객혈 등의 증상으로 내원한 경우, X-ray로 우선 폐의 결절을 확인하며, 이상이 있으면 객담을 이용하여, 항산성염색, 균배양, PCR 등을 이용해 최종 확진한다. 본 연수과정에서는 분자생물학적인 진단법으로 Real-time

PCR을 이용한 Cepheid사의 GeneXpert, PCR을 이용한 Line Probe Assay를 사용하였다. GeneXpert는 환자의 객담 샘플을 이용하여, 샘플의 전처리에서 Real-time PCR까지 자동 처리해주는 진단기기로써, 2시간이내에 결핵균 여부와 주요 항결핵제제인 Rifampicin내성을 확인할 수 있는 장점이 있어 국내에서도 결핵관리종합계획에 의해 도입이 진행되고 있는 것으로 알려져 있다.[5] 결핵의심환자의 객담시료를 2배 용량의 키트 반응액과 충분히 섞어준 후, 키트에서 제공되는 카트리지에 넣고, GeneXpert 기기에 넣어주면 기기 내부에서 전처리와 Real-time PCR이 진행된다. Rifampicin 내성을 결정하는 81bp의 rpoB gene 영역 내의 서로 다른 부분에 결합할 수 있는 5개의 probe에 형광물질을 붙여서 각각의 probe의 증폭여부에 따라 rpoB gene에서의 변이여부를 확인할 수 있다.(정상 증폭 : 변이없음. 증폭되지 않음 : 변이있음) rpoB gene의 변이가 없이 wildtype으로 존재한다면 Rifampicin에 감수성이 있다고 보고, 1개의 probe라도 mutation이 있으면 내성이 있다고 진단한다(그림3.).

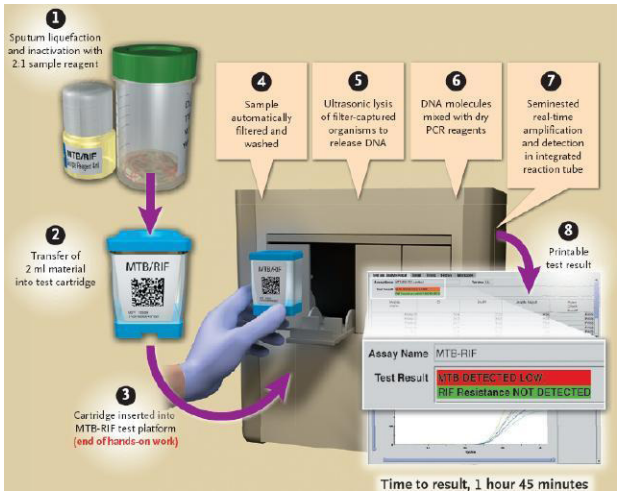


그림3. GeneXpert System

Line Probe Assay 역시 기본적인 원리는 GeneXpert와 비슷한데, 항생제 내성을 결정하는 유전자부위의 wild type이 제대로 있는지, 변이가 있는지 여부를 PCR, Probe hybridization으로 확인할 수 있다. 다양한 Line Probe 진단키트 중 독일 Hain Lifescience사의 MTBDR*plus*(결핵균, Rifampicin/Isoniazid내성 여부)와 MTBDR*sl*(결핵균, Quinolone/Amikacin, Capreomycin, Kanamycin, Viomycin/Ethambutol내성 여부)을 이번 연수에서 실습하였다. 먼저, 환자의 객담 샘플이나 배양된 균을 PCR로 증폭 후, 단일가닥으로 변성시킨 다음, 이 단일가닥과 Mycobacterium Tuberculosis Complex(*M. tuberculosis, M. bovis* 등), *rpoB* gene, *katG/inhA* gene(Isoniazid내성 관련), *gyrA* gene(Quinolone), *rrs* gene(Amikacin, Capreomycin, Kanamycin, Viomycin), *embB* gene(Ethambutol)에 특이적으로 결합 가능한 probe가 코팅된 strip을 중합반응하면 결핵균 여부와 항생제 내성 여부를 확인 할 수 있다(그림4).

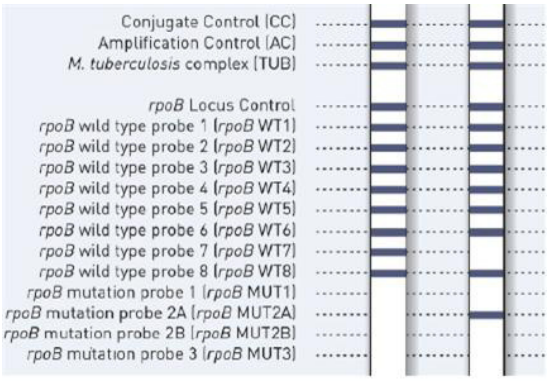


그림4a. MTBDR*plus*

(좌) : Rifampicine감수성 결핵균, (우) : Rifampicine내성 결핵균

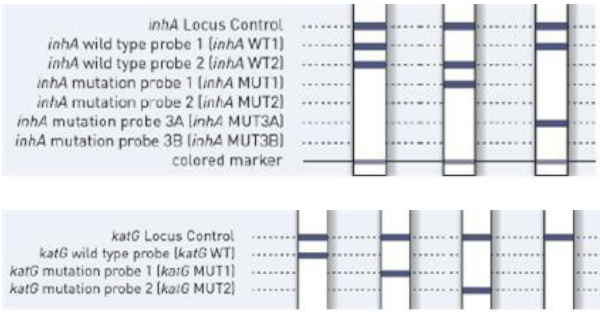


그림4b. MTBDRplus

: *inhA*와 *katG*모두 Isoniazid내성 결정 인자로 둘다 wildtype만 존재해야 감수성 균주임. 위 두 그림 모두 가장 좌측 결과가 감수성. 나머지는 내성의미.

가축은 사람과 달리 이상증상을 발견하여 결핵검진을 받는 경우는 많지 않고, 대부분 정기검진이나 도축검사과정에서 결핵을 확인하고 있다. 현재 국내에서 실시중인 소결핵병 공인검사법은 소의 미근부에 PPD를 접종하여 확인하는 단일피내검사를 기본으로 하며, 소결핵병 항체를 확인하는 ELISA, 배양된 결핵균이나 조직 내 결핵균을 확인하는 유전자검사법도 실시하고 있다. 소결핵병의 경우, 치료를 하고 있지 않기 때문에 상대적으로 항생제내성에 대한 문제는 중요하게 다뤄지지 않고 있다. 그러나 공중보건학적인 측면에

서 볼 때, 소결핵병균은 인수공통감염원으로써 아직 국내에서 소결핵병에 감염된 환자의 사례가 보고된 바는 없으나, 임상의 많은 케이스에서 결핵 의심증상이 있는 환자의 경우, Mycobacterium tuberculosis complex(인형결핵과 우형결핵 모두 포함)까지만 확인하는 경우가 많아 향후 발생 가능성도 배제할 수 없다고 본다.

파스퇴르연구소의 3대 미션은 교육, 연구, 공중보건으로 교육이 주요 미션에 들어가는 만큼 다양한 교육프로그램과 인턴쉽, 트레이닝 코스 등을 운영하고 있어, 관련 연구자들에게 좋은 기회를 제공하고 있다. (그림5.)

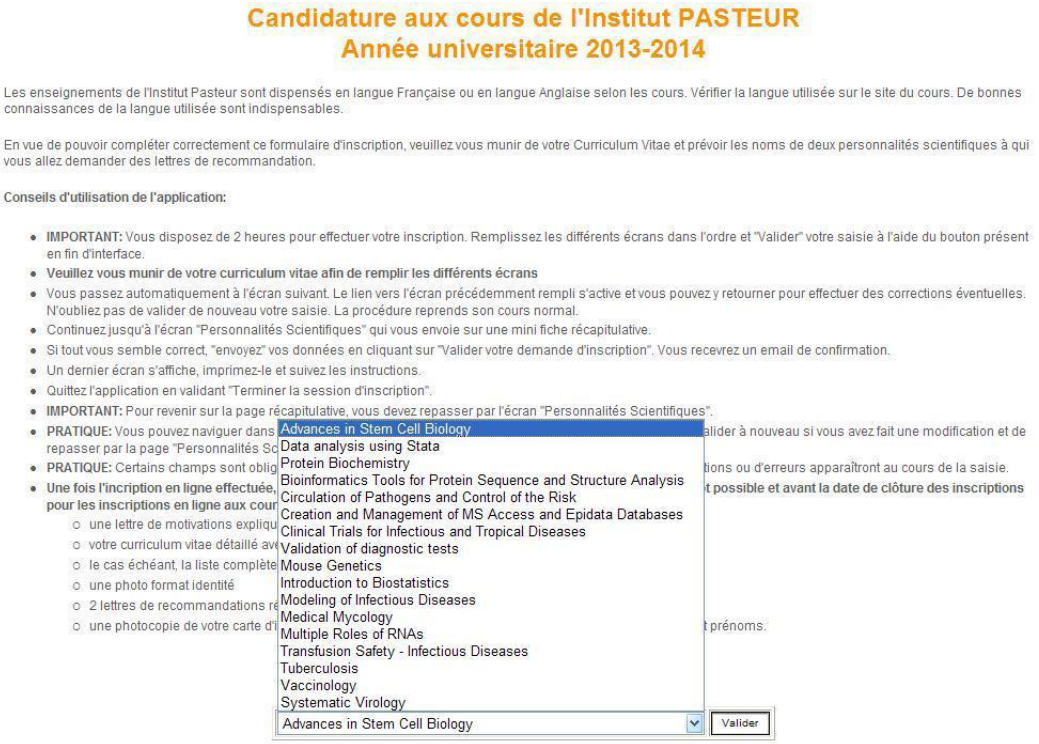


그림5. 2013-2014년 완료/계획 중인 트레이닝 코스. 이 밖에 인턴쉽, 박사과정, 포닥과정 등 다양한 교육프로그램을 운영 중에 있으며, 파스퇴르 연구소 홈페이지에서 확인가능하다. http://www.pasteur.fr/inscription

이번 연수프로그램도 파스퇴르 연구소 내의 전문가뿐만 아니라, 학계, 연구기관 및 WHO의 여러 전문가들의 강의로 구성되어 결핵의 역사에서부터 증상, 치료, 백신, 진단 등 전반적인 내용을 이론과 실습을 통해 배워볼 수 있었던 좋은 기회였다. 사람결핵 위주로 진행되었지만 M.tuberculosis와 M.bovis는 같은 Mycobacterium tuberculosis complex에 속하며 매우 유사한 특성을 지니고 있기 때문에 가축방역을 위한 진단 및 역학분석 등에도 많은 도움이 될 것으로 생각한다. 또한 이번 연수에는 유럽과 아시아, 아프리카에서 온 20명의 결핵관련 종사자들을 만날 수 있어 각국의 결핵관련 상황과 연구 분야에 대해 알아볼 수 있고, 연구네트워크를 형성할 수 있는 좋은 기회였다.

참고문헌

[1] WHO. Tuberculosis Profile
[2] Ricardo RD. 2006. Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis 86 : 77–109
[3] Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA 271(9) : 698–702
[4] Bryce MB, John MP, Margot AS et al. 2003. Developement of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. Int J Parasitol 33 : 555–566
[5] 질병관리본부 「결핵관리종합계획」