

Usefulness of PCR to *Mycobacterium Tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria from Paraffin-embedded Tissues

Yeon-Il Choi¹ and Hye-Young Kim²

¹Department of Clinical Pathology, Inha University Hospital, Incheon 400-711, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, Shinsung University, Dangjin 343-861, Korea

The purpose of this study was to evaluate the clinical utility of TB/NTM PCR by comparing the results of TB PCR to detect *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and nontuberculous mycobacteria (NTM) from paraffin-embedded tissue specimens. A total of 60 cases were tested using TB PCR and TB/NTM PCR. The MTB and NTM rate of TB/NTM PCR was 84.2% (16/19), 10.5% (2/19) in TB positive of TB PCR. The NTM rate of TB/NTM PCR was 29.3% (12/41) in TB negative of TB PCR. Fourteen different species of NTM were identified, the common isolate was *M. gordonae* (21.4%), *M. avium* (14.3%), *M. ulcerans* (7.1%), *M. interjectum* (7.1%), *M. gilvum* (7.1%), *M. fortuitum* (7.1%), *M. mucogenicum* (7.1%). The rare species identified were *M. farcinogenes* (7.1%), *M. tokaiense* (7.1%). Therefore, TB/NTM PCR is useful to differentiate MTB and NTM from paraffin-embedded tissue specimens and it is more effective in detecting NTM with TB PCR.

Keywords: NTM, TB PCR, TB/NTM PCR, Paraffin-embedded tissues

Corresponding author: Hye-Young Kim
Department of Clinical Laboratory Science,
Shinsung University, Dangjin 343-861, Korea
Tel: 82-41-350-1407
E-mail: khy@shinsung.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2014 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: May 19, 2014
Revised: June 23, 2014
Accepted: June 25, 2014

서 론

결핵은 인류 역사상 가장 많은 생명을 잃게 한 전염성 감염질환으로서 지금도 세계인구의 약 1/3이 결핵균에 감염되어 있으며, 매 초 1명의 비율로 새로 감염되고 있는 실정이다. 2010년 세계보건기구(WHO)에서 발간한 Global tuberculosis control report에 따르면 우리나라는 인구 10만명 당 결핵발생률이 90명, 사망률이 8.3명으로 34개 OECD 가입국가 중 가장 높은 것으로 나타났으며, 법정 전염병 중 유병률 및 사망률 1위로 전염성질환에 의한 사망원인의 50% 이상이라고 보고되고 있다(World Health Organization, 2011, 김, 2012).

결핵균 감염 진단방법으로 대한 결핵 및 호흡기학회에서는 항산균 도말검사 결과 양성인 경우를 폐결핵 진단기준 방법으로 제시하고 있다(Koh 등, 2008). 하지만 항산균 도말검사법이 간단하고, 신속하다는 장점이 있는 반면 민감도와 특이도가 낮고 결핵균과 비결핵성항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)의 감별이 어렵다는 제한점 있으며, 결핵의 유병률이 낮거나 NTM 동정률 및 감

염증이 많은 지역에서는 위양성의 가능성이 높아진다는 연구 보고가 있다(Koh 등, 2003). 이에 가장 확실한 진단방법으로 균수가 적어도 검출이 가능하고 약제감수성검사도 할 수 있는 배양법이 사용되고 있지만 배양시간이 오래 걸린다는 문제점 때문에 최근에는 결핵균 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction test for *M. tuberculosis*, TB-PCR)이 널리 사용되고 있다(윤 등, 2010). 하지만 오염에 의한 위양성의 문제점과 NTM을 검출할 수 없다는 단점이 보고되었다(Balasingham 등, 2009).

최근에는 미국, 유럽, 일본 등에서 후천성 면역결핍증 등 면역기능 저하 환자에서 발생하는 파종성감염과 기저질환이 없는 정상면역상태인 성인에서 NTM 폐질환 증가로 관심이 집중되고 있다(Johansen 등, 2002). NTM은 자연환경에 널리 분포되어 있기 때문에 임상 검체로부터 분리되어도 기회주의 감염균으로 간주되어 병원성여부를 판단하기가 힘들다(Peter 등, 2008;Mori, 2001). 그리고 일반적으로 결핵균에 유효하다고 알려진 항결핵제들이 NTM에는 효과가 없는 경우가 있으며, NTM의 종류에 따라 치료가 다른 경우가 많아 실제 치료효율이 높지 않다는 점이 우려해야할 부분이

다(Phillips와 von Reyn, 2001). 그러므로 결핵균과 NTM을 신속하고 정확하게 구별할 수 있는 검사법의 필요성에 대한 보고가 증가하고 있다(Hwang 등, 2011).

현재 임상에서는 결핵 진단을 위한 검체로 체액, 객담, 기관지 세척액 등이 사용되고 있으며, 이들 검체를 이용하여 TB-PCR 검사가 진행되고 있으나(Piersimoni와 Scarparo, 2003), 폐외 결핵인 경우에는 장기와 조직에서 병변이 나타나기 때문에 반드시 조직검사가 이루어진다. 그리고 Jordaán 등(1996)은 파라핀 조직에서 항산성염색에서 음성인 검체 중 PCR의 양성률이 16.7%로 보고하였으며, Arnold 등(1988)은 PCR 검사법이 민감도 83%, 특이도 98%로 보고된 바 있다. 이에 본 연구는 결핵이 의심되는 검체 중 파라핀 포매 조직을 검체로 사용하여 TB-PCR를 진행하였으며, 최근 임상 검체에서 검출 빈도가 높은 NTM을 신속하고 정확하게 감별하기 위하여 TB/NTM PCR를 사용하여 연구를 수행한 후 TB-PCR과 TB/NTM PCR 검사 결과를 비교 분석하여 결핵균과 NTM 감별에 대한 유용성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 검체

2013년 8월부터 12월까지 인천시 소재 한 대학병원에서 결핵이 의심되는 폐 25예, 대장 35예 생검 검체로 분자병리검사(TB PCR, TB/NTM PCR)가 의뢰된 환자 60예 파라핀 포매 조직을 검체로 사용하였다.

2. 조직학적 소견

생검 조직은 10% 중성포르말린에 고정 후 파라핀에 포매한 후 연속 절편하여 H&E 염색을 하였다. 조직학적 소견에서 육아종, 건락성 괴사병변, 다핵 거대세포의 유무를 400배에서 관찰하였다.

3. DNA 추출 및 농도 측정

포르말린고정 파라핀 포매 조직에서 10 µm씩 2장을 분절하여 탈파라핀한 다음 사용하였다. DNA 추출은 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하였으며, 추출된 DNA를 Nano Drop (CA, USA)를 이용하여 정량하고 최종 DNA의 양을 50 ng으로 맞추기 위해 추출된 DNA를 증류수로 희석하였으며, 최종 template DNA의 양은 50 ng이하로 하였다.

4. 조직 DNA 적절성 여부 확인

추출한 조직 DNA의 적절성 여부를 확인하기 위해 β-globin과 β-actin에 대한 PCR을 병행하여 실시하였다. β-globin 유전자의

primer 염기서열(5' 3')은 forward GAC ACA ACT GTG TTC ACT AG와 reverse AGG GTA GAC CAC CAG CAG C 였고, β-actin 유전자의 primer 염기서열(5' 3')은 forward ATC ATG TTT GAG ACC TTC AA 와 reverse CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA였고, PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 72°C에서 30초 주기로 35회 시행하고 72°C에서 5분간 연장하였다. 이에 증폭산물의 크기는 200 bp였다.

5. TB PCR

결핵균의 유전자 IS6110를 검출하는 M.TB PCR Kit (BioCore, Seoul, Korea)를 사용하여 nested PCR (MJ Research, Germany)을 시행하였다. IS6110 primer를 이용한 PCR 방법으로 1차 PCR 혼합액 16 µL에 검체 DNA 4 µL를 첨가하여 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 45초, 68°C에서 45초, 72°C에서 30초 동안 35회 반복 시행한 다음 72°C에서 5분 1차 연장 시행하였다. 2차 PCR 혼합액 18 µL에 1차 PCR 산물 2 µL를 넣고 반응시킨 후 95°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 45초, 65°C에서 45초, 72°C에서 30초 동안 25회 반복 시행한 다음 72°C에서 5분 연장 시행하였다. PCR 반응 후 반응물 10 µL를 2% agarose gel에서 전기영동하여 양성 대조군과 음성대조군을 대상으로 PCR 산물의 band를 확인하였으며, 1차 PCR 산물은 374 bp와 2차 PCR 산물은 158 bp로 확인하였으며, 이 중 158 bp로 증폭되어 나온 band를 TB로 판정하였다.

6. TB/NTM PCR

TB와 NTM을 구분할 수 있는 nested PCR 방법으로 고안된 TB/NTM PCR Kit (BioCore, Korea)는 모든 마이코박테리아를 검출할 수 있는 *rpoB* 유전자와 MTB complex에 존재하는 IS6110 유전자를 이용한 검사법이다. IS6110/*rpoB* primer를 이용한 PCR법으로 TB/NTM PCR 혼합액을 사용하였으며, TB PCR과 같은 방법으로 실험을 진행하였다. PCR 반응 후 반응물 10 µL를 2% agarose gel에서 전기영동하여 TB와 NTM을 구분하였다. TB (IS6110) 158 bp, NTM (*rpoB*) 235 bp로 나타나며, TB complex 양성인 경우에는 235 bp, 158 bp 두 개의 band가 모두 증폭되거나 158 bp band만 증폭된다. NTM 양성인 경우 235 bp만 증폭된 것을 확인하여 판정하였다.

7. DNA 염기서열분석법

TB/NTM PCR에서 NTM 양성으로 확인된 검체의 균 명을 확인하기 위하여 BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit를 이용하였으며, ABI Prism 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 그리

고 염기서열은 균 동정을 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교하였다.

결 과

1. TB PCR과 TB/NTM PCR

임상 검체에서 PCR검사가 의뢰된 환자 60예의 파라핀 포매 조직을 대상으로 MTB PCR Kit와 TB/NTM PCR Kit를 이용한 검사를 비교한 결과, TB PCR를 시행한 TB 양성 19예 검체 중 TB/NTM PCR에서는 16예(84.2%)가 결핵균, 2예(10.5%) 검체에서 NTM, 1예(5.3%) 검체가 결핵균이 아닌 것으로 나타났다. 또한 TB PCR 결과 결핵 음성으로 나온 검체 41예 검체 중 TB/NTM PCR에서 12예(29.3%) 검체가 NTM, 29예(70.7%) 검체가 결핵균이 아닌 것으로 확인되었다(Table 1)(Fig. 1, 2).

2. DNA 염기서열 분석

TB PCR와 TB/NTM PCR 검사법 결과 중에서 NTM으로 나온 결과를 더 정확한 방법으로 균 명을 확인하기 위해서 DNA 염기서열 분석법을 진행하였다. NTM 14예 검체의 DNA 염기서열 분석 결과

Table 1. Comparison of TB PCR and TB/NTM PCR

	TB/NTM PCR			Total
	TB positive (%)	NTM positive (%)	TB/NTM negative (%)	
TB PCR				
TB Positive	16 (84.2%)	2 (10.5%)	1 (5.3%)	19
TB Negative	0 (0%)	12 (29.3%)	29 (70.7%)	41
Total	16	14	30	60

TB, *Mycobacterium tuberculosis*; TB, Tuberculosis; NTM, non-tuberculous mycobacterium; PCR, polymerase chain reaction.

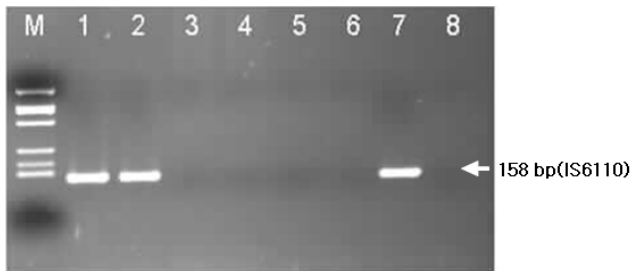


Fig. 1. Results for 2% agarose gel electrophoresis of TB PCR. lane M, BioCore Size Marker; lane 1,2, TB Positive (158 bp) Sample; lane 3,4, NTM Positive Sample; lane 5,6, Negative Sample; lane 7, Positive Control; lane 8, Negative Control.

M. gordonae 3예(21.4%), *M. avium* 2예(14.3%), *M. ulcerans* 1예(7.1%), *M. interjectum* 1예(7.1%), *M. farcinogenes* 1예(7.1%), *M. gilvum* 1예(7.1%), *M. tokaiense* 1예(7.1%), *M. fortuitum* 1예(7.1%), *M. mucogenicum* 1예(7.1%)로 동정되었으며, 미동정된 NTM이 2예(14.3%)였다(Table 2).

고 찰

우리나라 결핵 관련 통계를 보면 신환자율이 2005년에 인구 10만명 당 폐결핵 30,098명이었으며, 2007년부터 감소하다 2011년부터 증가하여 2012년에는 31,075명으로 증가를 보였으며, 폐외 결핵은 2005년에 5,151명에서 2012년에는 8,470명으로 증가 추세를 보였다. 또한 도말 양성을 결핵으로 진단한 경우 2005년 11,638명에서 2012년 12,137명으로 증가율을 보이고 있다 (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). 이와 같은 통계는 신속하고 정확한 결핵환자의 조기 진단법의 개발과 효과적인 치료법의 필요성을 보여 주고 있다.

국내 임상에서는 결핵균 배양검사가 특이도가 높지만 시간이 오래 걸리는 단점이 있어 항산균 도말 검사가 민감도가 낮은 검사법

Table 2. Identification of NTM by DNA sequencing

Species	No. (%)
<i>M. gordonae</i>	3 (21.4)
<i>M. avium</i>	2 (14.3)
<i>M. ulcerans</i>	1 (7.1)
<i>M. interjectum</i>	1 (7.1)
<i>M. farcinogenes</i>	1 (7.1)
<i>M. gilvum</i>	1 (7.1)
<i>M. tokaiense</i>	1 (7.1)
<i>M. fortuitum</i>	1 (7.1)
<i>M. mucogenicum</i>	1 (7.1)
Unidentifiable	2 (14.3)
Total	14 (100)

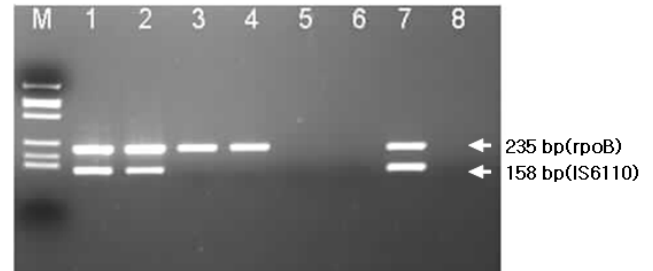


Fig. 2. Results for 2% agarose gel electrophoresis of TB/NTM PCR. lane M, BioCore Size Marker; lane 1,2, TB Positive Sample (158 bp/235 bp); lane 3,4, NTM Positive Sample (235 bp); lane 5,6, Negative Sample; lane 7, Positive Control; lane 8, Negative Control.

이지만 신속한 결과를 확인할 수 있어 이 결과에서 양성이면 결핵으로 진단하여 항결핵제 치료를 시행하고 있으며, 도말검사에서 양성인 경우 배양에서 NTM으로 동정되는 경우가 흔하다(Koh WJ와 Kwon, 2008; Balasingham 등, 2009).

2000년 미국 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)은 객담 항산균 도말검사에서 양성인 경우에는 핵산증폭검사를 시행하여 양성이면 폐결핵으로 잠정 진단하고, 만일 도말검사 양성이고, 핵산증폭검사 음성이면 검체 내에 inhibitor가 있는지 검사하여 inhibitor가 없다면 NTM에 감염된 것으로 잠정 진단한 후 최종 진단은 배양결과로 판단하도록 권장하고 있어(Centers for Disease Control and Prevention, 2000) 미국에서는 폐결핵의 진단에 핵산증폭검사가 상대적으로 광범위하게 이용되고 있다(Schluger, 2001).

최근 임상에서도 항산균 도말과 배양검사 방법의 단점을 보완하기 위하여 검체에 균수가 적어도 진단이 가능하며, 높은 민감도 및 특이도와 함께 신속한 결과와 조기진단이 가능한 TB-PCR 진단법이 많이 사용되고 있으며(Jung 등, 2008), 대부분 객담이나 기관지 세척액 검사 등을 검체로 진단에 이용하다 보니 폐 이외의 결핵인 경우에는 조직검체로 진단하기 위해 민감도가 높은 TB-PCR이 사용되고 있다(Chawla 등, 2009). Popper 등(1994)은 파라핀 포매 조직에서 항산균 도말에서 음성인 검체 중 TB-PCR 양성인 13.3%로 나왔으며, 김 등(2000)에서는 23.8% 결과로 나타났으며, 도말 양성이지만 TB-PCR에서 음성인 경우는 NTM으로 진단하는 것이 유용하다는 보고가 있었다(Yu 등, 2004). 그러나 결핵의 유병률과 발생률이 높은 국내의 경우에는 활동성 결핵균이 없는 환자의 검체에서도 적은 수의 결핵균이 균체를 형성하여 PCR 검사 결과 위양성으로 나타나며, 잔효 효과나 교차오염에 의해 위양성 결과가 발생한다는 연구결과가 있었다(Araj 등, 2000; Johansen 등, 2002). 또한 PCR에서 검체 내에 핵산증폭을 저해하는 물질이 있어 위음성으로 나타났다는 보고가 있었다(Levidiotou 등, 2003).

이에 본 연구에서는 결핵이 의심되는 파라핀 포매 조직검체를 사용하여 TB PCR과 TB/NTM PCR 검사법을 시행한 결과 TB PCR에서 결핵 양성 검체는 31.7% (19/60예)로 나타났으며, 이 중 TB PCR와 TB/NTM PCR 결과 84.2% (16/19예)의 양성률을 보였다. 그리고 TB PCR 음성 결과 71.9% (41/60예), TB/NTM PCR 결과 70.7% (29/41예)에서 음성으로 나왔으며, 29.3% (12/41예)에서 TB/NTM PCR에서 NTM 양성결과로 확인 되었다. 그리고 TB PCR이 양성 결과를 기준으로 할 때 TB/NTM PCR의 위음성률이 15.6% (3/19예)이며, TB PCR이 음성일 경우는 TB/NTM PCR의 위양성률은 29.3% (12/41예)로 나타났다. 이와 같은 결과로 TB/NTM PCR이 NTM 진단에 특이도가 높음을 확인할 수 있었다. 최근 파라

핀포매 조직에서 사용되는 PCR이 유용한 반면, PCR primer인 IS6110, Mpb64 및 *mpoB* 부위에 따른 차이 보고와 파라핀 조직이 갖는 한계나 조직에 있는 항산균의 개수나 분포 등에 따른 문제점도 제기되고 있다(Lee 등, 2010). 그러므로 항산균 진단에 오류를 줄이기 위해서는 TB PCR과 TB/NTM PCR를 병행해서 보완적으로 사용하는 것이 필요하다고 사료된다.

미국, 캐나다, 서유럽에선 객담에서 NTM이 분리된 환자 중 약 40~50%, 홍콩, 일본 등 아시아에서는 약 10~20%가 NTM 폐질환을 일으켰다고 보고하였다(O'Brien 등, 1987; Hosker 등, 1995). 국내에서도 1981년 NTM 중 MAC (*Mycobacterium avium* complex) 폐질환 증례가 처음으로 보고된 후 1990년부터 이후 빠른 속도로 증가하고 있으며, 항산균에 대한 NTM 분리 비율의 증가하고 있다(Koh와 Kwon, 2008; Lee 등, 2009). 최근의 국내자료에 의하면 임상검체에서 분리된 항산균 중 NTM이 차지하는 비율이 20~30%라는 보고(Koh 등, 2003)와 2002년 대학병원에서 호흡기검체를 대상으로 항산균 도말 양성이고, 배양검사에서 양성인 균주 중에서 NTM이 12.2%로 확인된 결과(Lee 등, 2005)와 비교해보면, 본 연구에서의 NTM의 검출 확률이 23.3% (14/60예)로 더 높게 나타났다. 이와 같은 결과로 NTM의 검출률은 앞으로 증가할 것이라 추측되며, 더우기 NTM의 진단법이 중요할 것으로 사료된다.

또한 연구에서 NTM으로 확인된 검체들을 정확하게 동정하기 위하여 염기서열 검사를 한 결과 *M. gordonae* 21.4% (3예)로 가장 높은 빈도를 나타냈으며, *M. avium* 14.3% (2예), *M. ulcerans*, *M. interjectum*, *M. farcinogenes*, *M. gilvum*, *M. tokaiense*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*은 7.1% (1예)로 분리 동정되었다.

미국과 일본에서 NTM 폐질환의 가장 주요한 원인균은 *Mycobacterium avium* complex (MAC)로 60~80% (Sakatani, 1999), 두 번째로 흔한 원인균으로 *M. kansasii*가 15~20%를 차지하며, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* 등이 5% 미만으로 알려져 있다(O'Brien 등 1987). 1981년부터 1994년까지 14년간 대한결핵협회 결핵연구원에 의뢰된 검체 중 총 158검체에서 159건의 NTM을 전통적인 생화학적 방법으로 동정한 결과 NTM의 균주 분포는 *M. avium-intracellulare* 104건(65.2%), *M. fortuitum* 20건(12.7%), *M. chelonae* 15건(9.5%), *M. gordonae* 7건(4.4%), *M. terrae* 5건(3.2%), *M. scrofulaceum* 3건(1.9%), *M. kansasii* 2건(1.3%), *M. szulgai* 2건(1.3%), *M. avium-intracellulare & terrae* 1건(0.6%)으로 확인되었으며(정 등, 2008), 2000년까지 NTM 동정법으로 사용되다가 2001년부터는 PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) 방법을 이용하여 분류한 결과 가장 발생 빈도가 높은 균주는 MAC (65.3%)이었고, 그 다음으로 *M. abscessus* (11.6%), *M. fortuitum*

complex (7.1%), *M. chelonae* complex (6.3%), *M. kansasii* (4.3%), *M. szulgai* (0.8%), *M. celatum* (0.5%), *M. scrofulaceum* (0.1%) 그리고 *M. marinum* (0.06%) 순이었다(Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

위 자료를 종합하면 NTM에 의한 폐질환에서 MAC가 여전히 가장 흔한 원인균이며, 지역에 따른 차이는 있지만 *M. abscessus*, *M. fortuitum* complex, *M. chelonae* complex, 그리고 *M. kansasii* 등이 호흡기 검체로부터 흔히 분리되는 균종임을 알 수 있다.

또한 대한 결핵협회에서 우리나라 임상환자에서 분리된 NTM 조사 결과 2009년도에 분리 동정된 MTN의 종은 *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. lentiflavum*, *M. triviale*, *M. parascrofulaceum*, *M. arupense*, *M. obuense*, *M. kumamotoense*, *M. senuense*, *M. seoulense*, *M. paraseoulense* 등 21 균종을 확인되었고, 2010년도에는 *M. massiliense*, *M. mucogenicum*, *M. parafortuitum*, *M. celatum*, *M. scrofulaceum*, *M. aubagnense*, *M. interjectum*, *M. neoaurum*, *M. kubicae*, *M. nonchromogenicum*, *M. shimoidei*, *M. phlei*, *M. phocaicum*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans*, *M. wolinskyi*, *M. xenopi*, *M. goodii* 등 18종을 추가하였고, 2011년도에는 *M. shinjukuense*, *M. gilvum*, *M. timonense*, *M. elephantis*, *M. bolletii* 등 5종의 희귀 NTM를 확보하여 총 44종이며, 향후 NTM 연구에 표준균주로 사용할 수 있게 되었다는 보고(유 등, 2011)와 비교한 결과 본 연구에서 동정된 MTN 중 *M. farcinogenes*, *M. tokaiense* 균종은 새롭게 확인된 균주임을 알 수 있었다.

본 연구에서 가장 높은 빈도로 분리된 *M. gordonae*는 객담이나 뇨 검체에서 드물지 않게 배양되지만 대개 오염균으로서 인체 감염은 극히 드물고 후천성 면역 결핍증과 같은 면역 기능이 저하된 환자에서 감염을 일으킬 수 있다는 보고가 있어(Wayne와 Sramek, 1992) 가장 높은 빈도로 분리된 이유가 실험실 오염과 관련 있는지를 조사할 필요가 있다고 사료된다. 그리고 두 번째로 분리된 *M. avium* complex 전 세계적으로 폐질환의 가장 흔한 원인균 알려져 있으며, 후천성 면역결핍증 환자뿐만 아니라 면역기능이 정상적인 사람에서도 분리된다는 보고가 있다(Primm 등, 2004). *M. ulcerans*는 괴사와 궤양을 발생시키는 독소를 생성하며, Buruli 궤양, 결핵 및 나병 이후 인간에게 3번째로 흔한 폐질환의 원인균으로 알려져 있다(Sizaire 등, 2006). 또한 *M. interjectum*는 1993년에 처음으로 드물게 인체감염의 원인균이라고 새롭게 보고 되었으며(Springer 등, 1993), *M. mucogenicum*에 의한 인체 감염은 주로 중심정맥관 관련 패혈증 또는 외상 후 창상감염을 일으키고, 육아

종성 간염환자와 간경화 환자에서 균혈증을 일으키는 원인균으로 보고되었다(신 등, 2004). *M. fortuitum*은 토양과 자연수 등 자연 환경에 널리 분포하는 균으로 인체감염으로는 주로 피부나 연조직 감염, 수술 후 창상감염, 림프절염, 중심도관감염 등이 보고되어 왔다(Brown, 1985). *M. abscessus*에 의한 감염의 조직학적 특징은 진피와 피하에 다형백혈구세포로 이루어진 농양과 상피양세포 및 거대세포, 괴사부위 등을 포함하는 육아종 등이 공존하는 특징적인 이상성(dimorphic)의 염증반응 보였으나(Swetter 등, 1993), 우리나라는 외국과 달리 *M. abscessus*에 의한 폐질환의 발생률이 월등히 높았고(Koh 등, 2008), 피부질환역시 증가할 것으로 추정되기 때문에 정확한 진단과 치료적 측면의 조치가 필요하다(Ryu 등, 2005). 그리고 본 연구에서 새롭게 동정된 *M. tokaiense*는 드물게 뇌하수체줄기에 육아종의 원인균으로 보고된 예가 있었으며, 면역억제제 사용 시 증가하는 것으로 알려져 있다(Kondo 등, 2006).

결론

본 연구에서 폐 25예, 대장 35예 생검 검체를 이용한 파라핀 포매 조직에서 결핵균과 MTN 진단에 오류를 줄이고 효과적으로 정확한 진단을 하기 위해서는 TB PCR과 TB/NTM PCR 검사를 병행해서 보완적으로 사용하는 것이 필요하다고 사료된다. 또한 이전에는 NTM 균주들을 단순히 오염균으로만 여겼지만, 최근에는 인체 감염의 원인균으로 의의가 증가하고 있어, NTM 균주의 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 검사법의 개발이 필요하며, 국내 임상 검체에서 새롭게 동정되는 NTM 균주에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

References

1. Araj GF, Talhouk RS, Itani LY, Jaber W, Jamaledine GW. Comparative performance of PCR-based assay versus microscopy and culture for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical respiratory specimens in Lebanon. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4:877-881.
2. Arnold M, Chan CY, Cheung SW, Vanhasselt CA, French GL. Diagnosis of nasopharyngeal tuberculosis by detection of tubercylostearic acid in formalin fixed, paraffin wax embedded tissue biopsy specimens. *J Clin Pathol.* 1988. 41:1334-1336.
3. Balasingham SV, Davidsen T, Szpinda I, Frye SA, Tønjum T.

- Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy. *Mol Diagn Ther*. 2009, 13:137-151.
4. Brown TH. The rapidly growing mycobacteria *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. *Infect Control*. 1985, 6:283-288.
 5. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2000, 49:593-594.
 6. Centers for Disease Control and Prevention. Current status of nontuberculous mycobacterial infection. *Public Health Weekly Report*. 2009, 2:389-407.
 7. Centers for Disease Control and Prevention. Status of notified Tuberculosis in Korea, 2012. <http://www.cdc.go.kr/>, last visited on 14 April 2014.
 8. Chawla K, Gupta S, Mukhopadhyay C, Rao PS, Bhat SS. PCR for M. tuberculosis in tissue samples. *J Infect Dev Ctries*. 2009, 3:83-87.
 9. Hosker HS, Lam CW, Ng TK, Ma HK, Chan SL. The prevalence and clinical significance of pulmonary infection due to non-tuberculous mycobacteria in Hong Kong. *Respir Med*. 1995, 89:3-8.
 10. Hwang SS, Oh KJ, Jang IH, Uh Y, Yoon KJ, Kim HY, et al. Evaluation of the Diagnostic Performance of the AdvanSure TB/NTM Real-Time PCR Kit for Detection of Mycobacteria. *Korean J Clin Microbiol*. 2011, 14:55-59.
 11. Johansen IS, Thomsen VØ, Johansen A, Andersen P, Lundgren B. Evaluation of a new commercial assay for diagnosis of pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002, 21:455-460.
 12. Jordaan HF, Schneider JW, Schaaf HS, Victor TS, Geiger DH, Vanhelden PD. Papilonectrotic tuberculid in children. *Am J Dermatopathol*. 1996, 18:172-185.
 13. Jung CL, Kim MK, Seo DC, Lee MA. Clinical Usefulness of Real-time PCR and Amplicor MTB PCR Assays for Diagnosis of Tuberculosis. *Korean J Clin Microbiol*. 2008, 11:29-33.
 14. Koh WJ, Kwon OJ, Yu CM, Jeon KM, Suh GY, Chung MP, et al. Recovery rate of nontuberculous mycobacteria from acid-fast-bacilli smear positive sputum specimens. *Tuberc Respir Dis*. 2003, 54:22-32.
 15. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective. *J Korean Med Sci*. 2005, 20:913-925.
 16. Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K, Kim TS, Lee KS, Park YK, et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. *Infect Chemother*. 2008, 40:297-300.
 17. Koh WJ, Kwon OJ. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease. *Korean J Med*. 2008, 74:120-131.
 18. Kondo A, Mori K, Iwata J, Tamura M, Yamamoto T, Nakao Y, et al. Caseous necrotic granuloma in the pituitary stalk due to nontuberculous Mycobacteria (*Mycobacterium tokaiense*) infection-case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2006, 46:80-83.
 19. Lee HS, Lee HN, Im SY, Lee YS, Lee KY, Choi YJ. Comparison of Various Detection Methods of Mycobacterium Species in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue with Chronic Granulomatous Inflammation. *Korean J Pathol*. 2010, 44:259-266.
 20. Lee JK, Kwon HY, Kwon JK, Lee HJ, Lee DW, Lee YJ, et al. Recovery Rate of Nontuberculous Mycobacteria and the Clinical Course of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease at a Secondary Hospital. *Tuberc Respir Dis*. 2009, 67:199-204.
 21. Lee JY, Choi HJ, Lee HY, Joung EY, Huh JW, Oh YM, et al. Recovery Rate and Characteristics of Nontuberculous Mycobacterial Isolates in a University Hospital in Korea. *Tuberc Respir Dis*. 2005, 58:385-391.
 22. Levidiotou S, Vrioni G, Galanakis E, Gesouli E, Pappa C, Stefanou D. Four-year experience of use of the Cobas Amplicor system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and nonrespiratory specimens in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003, 22:349-356.
 23. Mori T. Atypical mycobacteriosis. *Nippon Rinsho*. 2001, 59:197-204.
 24. O'Brien RJ, Geiter LJ, Snider DE Jr. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States: results from a national survey. *Am Rev Respir Dis*. 1987, 135:1007-1014.
 25. Peter-Getzlaff S, Lüthy J, Böddinghaus B, Böttger EC, Springer B. Development and evaluation of a molecular assay for detection of nontuberculous mycobacteria by use of the cobas amplicor platform. *J Clin Microbiol*. 2008, 46:4023-4028.
 26. Phillips MS and von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 2001, 33:1363-1374.
 27. Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2003, 41:5355-5365.
 28. Popper HH, Winter E, Hofler G. DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*. 1994, 101:738-741.
 29. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2004, 17:98-106.
 30. Ryu HJ, Kim WJ, Oh CH, Song HJ. Iatrogenic *M. abscessus* infection associated with acupuncture: clinical manifestations and its treatment. *Int J Dermatol*. 2005, 44:846-850.
 31. Sakatani M. Nontuberculous mycobacteriosis: the present status of epidemiology and clinical studies. *Kekkaku*. 1999, 74:377-384.
 32. Schluger NW. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001, 164:2020-2024.
 33. Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portaels F. *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect Dis*. 2006, 6:288-296.
 34. Springer B, Kirschner P, Rost-Meyer G, Schröder KH, Kroppenstedt R, Böttger E. *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. *J Clinical Microbiol*. 1993, 31:3083-3089.
 35. Swetter SM, Kindel SE, Smoller BR. Cutaneous nodules of *Mycobacterium chelonae* in an immunosuppressed patient with preexisting pulmonary colonization. *J Am Acad Dermatol*. 1993, 28:352-355.
 36. Wayne LG, Sramek HA. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1992, 5:1-25.

37. World Health Organization. Global Tuberculosis Control:WHO Report. Geneva: World Health Organization, 2011.
38. Yu CM, Koh WJ, Ryu YJ, Jeon K, Choi JC, Kang EH, *et al.* Usefulness of PCR test for *M. tuberculosis* for the differentiation of pulmonary tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease in patients with smear-positive sputum. *Tuberc Respir Dis.* 2004, 57:528-534.
39. 김은중, 최우순, 황석연. 임상가검물과 파라핀 포매 조직에서 PCR법을 이용한 결핵균의 검출. *대한의생명과학회지.* 2000, 6:55-63.
40. 김희진. 한국에서의 결핵현황. *대한내과학회지.* 2012, 82:257-262.
41. 신정환, 김혜란, 이영민, 정윤성, 이선호, 김성률 등. 만성폐쇄성폐질환 이 동반된 폐렴환자에서 발생한 *Mycobacterium mucogenicum* 균 혈증 1예. *대한진단검사의학회지.* 2004, 24:45-48.
42. 유희경, 심명섭, 양정성, 박영길, 김창기, 김희진. 우리나라 임상환자에서 분리된 비결핵마이코박테리아. *대한결핵 및 호흡기학회 추계학술대회.* 2011, 112:178.
43. 윤은영, 조수희, 고세일, 백종하, 김유은, 마정은 등. 결핵균과 비결핵성 항산균 검출에 Real-time PCR의 유용성. *대한결핵 및 호흡기학회지.* 2010, 69:250-255.
44. 정윤성, 김성률, 장철훈, 이선호. 5년간 울산대학교병원에서 HPLC법을 이용한 Mycobacteria의 동정과 균종 분포. *대한진단검사의학회지.* 2008, 28:24-33.