



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

보건학 석사 학위논문

결핵균 균삭형성(cord formation)과

결핵치료를 위한 1차 약제 내성 평가

M. tuberculosis Cord Formation and Primary Drug
Resistance Evaluation for Tuberculosis Treatment

2015 년 6 월

서울대학교 보건대학원

보건학과 보건학전공

이세경

결핵균 균삭형성(cord formation)과
결핵치료를 위한 1차 약제 내성 평가

M. tuberculosis Cord Formation and Primary Drug
Resistance Evaluation for Tuberculosis Treatment

지도교수 정 해 원

이 논문을 보건학 석사학위논문으로 제출함

2015 년 4 월

서울대학교 보건대학원
보건학과 보건학전공
이세경

이세경의 석사 학위 논문을 인준함

2015 년 6 월

위 원 장 조 성 일 (인)

부 위 원 장 성 주 현 (인)

위 원 정 해 원 (인)

국문초록

결핵균 균삭형성(cord formation)과 결핵치료를 위한 1차 약제 내성 평가

이 세 경

서울대학교 보건대학원

보건학 전공

지도교수 정 해 원

연구배경 : 결핵은 전세계적으로 AIDS에 이어 성인 사망원인의 두 번째를 차지하는 감염성 질환으로 OECD 가입국 중 우리나라의 결핵 발생률 및 사망률은 가장 높은 수준을 보이고 있다. 최근 결핵 발병률의 증가와 함께 다제내성 결핵균(multidrug-resistant tuberculosis, MDR TB)과 광범위내성 결핵(extensively drug-resistant tuberculosis; 이하 XDR-TB) 균이 결핵 퇴치에 큰 위협이 되고 있다. 이와 같은 약제내성 결핵의 비율은 결핵 치료를 위해 중요한 비중을 차지하기 때문에 결핵 치료 시

결핵균(*M. tuberculosis*; MTB)의 내성이 진행되는 것을 신속히 판단하는 것이 매우 중요하다. 그러나 결핵 치료 시 내성으로 이완되는 경우, 항결핵제인 아이나(Isoniazid)와 리팜핀(Rifampin) 약제 감수성 검사결과는 1~2개월이 소요되어 2차약제 치료시기가 늦어지게 된다. 결핵 진단과 치료 시 항결핵제 감수성검사와 항산성염색 도말검사를 거치게 되는데, 결핵균을 액체 배양하여 항산성염색 도말검사를 하면 균이 특유한 실타래 모양으로 성장하는 것을 확인할 수 있다. 이것을 결핵균의 균삭형성(cord formation)이라 하며 이것은 독성 결핵균의 지질 표면에 존재하는 트레할로오스 (trehalose-6,6' -dimycolate; TDM)에 의한 것이다. 환자에게 분리된 항결핵제 복용이력이 없는 결핵의 경우 균삭 형성을 보이다가 항결핵제 복용 시 약제감수성이 있을 경우 균삭 형성이 보이지 않는 것을 관찰하였다. 항결핵제 내성검사에서 감수성으로 보고 되었으나, 균삭 형성을 계속적으로 보이는 경우 추후 내성 결핵으로 이완 되기도 한다.

연구목적: 결핵 균삭형성과 항결핵제 감수성 결과와 일정한 연관성이 있다는 가설로, 결핵균삭이 형성된 군과 미 형성된 군을 구분하고 결핵1차 약제 약제인 아이나(Isoniazid)와 리팜핀(Rifampin) 약제 감수성 결과를

비교하여 연관성을 증명하여 신속한 내성결핵 이완 진단을 위한 검사학적 방법을 마련하기 위함이 본 연구의 목적이다. 또한 결핵균속 독성에 대한 인간대상 연구 자료를 마련하여 국가차원의 결핵관리 사업에 이바지 하고자 한다.

연구방법: 2012년 5월부터 2013년 12월까지 삼성서울병원에서 결핵균이 동정된 환자 검체 총 583건을 대상으로, 검체에서 분리된 결핵균을 액체 배양하여 항산성염색도말검사와 항결핵제 내성검사를 시행하였다. 항산성염색 도말검사 결과 균삭형성이 나타나는 경우와 무형성을 구분하고, 동정된 결핵균에 대해 1차 약제 검사감수성 검사 결과 균삭형성과 약제 내성과 일정한 연관성이 있는지 확인하였다.

연구결과: 결핵균이 검출된 검체 583건 중 균삭형성이 된 경우는 192건으로 33.0% 였다. Isoniazid(INH)와 Rifampicin(RIF)의 감수성검사 검체 전체비율은 감수성/감수성 505건(86.6%), 내성/감수성 40건(6.9%), 내성/내성 37건(6.3%), 감수성/내성 1건(0.2%)이며, 균삭이 형성된 검체의 감수성 결과는 감수성/감수성 144건(75.0%), 내성/감수성 24건(12.5%), 내성/내성 24건(12.5%)이었으며, 균삭 무형성 검체에서의

INH와 RIF의 감수성 검사는 감수성/감수성 361건(92.3%), 내성/감수성 16건 (4.1%), 내성/내성 13건(3.3%), 감수성/내성 1건 (0.3%)건 이었다. 균삭 형성 검체에서의 INH 내성은 25% (48/192)로 균삭 무 형성 검체에서의 INH 내성 7.42% (29/391)에 비해 통계학적으로 유의하게 높았으며 ($p < 0.0001$), 균삭 형성 검체에서의 RIF 내성도 12.5(24/192)삭 무 형성 검체의 RIF 내성 3.58%(14/391)에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다 ($p < 0.0001$).

고찰 및 요약: 항산성염색 도말검사 시 균삭형성이 나타나는 경우와 무형성을 구분하고, 동정된 결핵균에 대해 1차 약제 검사감수성 검사 결과를 비교하였을 때 균삭형성과 약제 내성과 일정한 연관성이 있는 것을 확인하였다. 균삭이 형성되지 않은 군에 비해 균삭이 형성된 군에서 결핵 1차 항결핵제인 이소니아지드(Isoniazid) 리팜피신(Rifampicin) 내성비율이 통계적으로 유의하게 높았다. 균삭 형성 유무에 따른 감수성 검사만으로 결핵균의 내성 확률을 판단하기는 어렵지만 항산성염색 도말법으로 균삭형성을 신속히 확인하여 장시간 소요되는 항결핵제 약제감수성검사 결과가 나오기 전, 내성결핵이완을 예비진단 할 수 있는 검사학적 방법으로

유용하게 이용할 수 있을 것으로 판단된다

주요용어: 다제내성 결핵(MDR-TB), 광범위 내성결핵(XDR-TB),
균삭형성(cord formation), cord factor, TDM(trehalose-6,6'-dimycolate)

학번: 2012-23736

목차

I. 서론

- 1. 연구 배경 및 필요성.....5
- 2. 연구 목적..... 12
- 3. 용어의 정의..... 14

II. 연구 방법

- 1. 연구대상..... 15
- 2. 결핵균 배양검사..... 16
- 3. 항산성도말검사 및 균삭형성 확인.....18
- 4. 결핵균동정19
- 5. 약제감수성검사..... 20
- 6. 통계분석..... 21

III. 결과

1. 연구대상 개요.....	23
2. 결삭형성률.....	27
3. 균삭형성과 1차약제 내성.....	30
4. 질병력에 따른 균삭형성 분포.....	33
IV. 고찰.....	38
V. 요약 및 결론.....	46
VI. 참고문헌.....	47

List of Tables

Table1. Characteristics of study group.....	26
Table2. Cord formation group by age.....	28
Table3. Cord formation in tuberculosis by drug resistance.....	30
Table4. Isoniazid(INH) resistance in cord and non-cord tuberculosis bacilli.....	31
Table5. Rifampin(RIF) resistance in cord and non-cord tuberculosis bacilli.....	32
Table6. Cord formation by disease and smoking status.	35
Table7. Drug resistance by cord formation in DM.....	36
Table8. Drug resistance by cord formation in non-DM.....	37

List of figures

Figure1. Algorithm for treatment of *Mycobacterium tuberculosis*.....10

Figure2..... 29

a: Cord-formation of tuberculosis bacilli in Acid-fast stain(x 100)

b: Non-cord formation of tuberculosis bacilli in Acid-fast stain(x 1000)

I. 서론

1. 연구 배경 및 필요성

결핵(Tuberculosis, TB)은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)을 원인으로 하는 호흡기 감염병으로, 전세계적으로 AIDS에 이어 성인 사망원인의 두 번째를 차지한다. 2012년 세계보건기구(World Health Organization:WHO)의 보고에 따르면 세계적으로 해마다 새로 결핵 진단을 받은 사람은 약 860만명에 이르며, 해마다 130만 명이 결핵으로 목숨을 잃고 있다¹. 우리나라는 OECD 가입국 중 결핵 발생률 및 사망률이 가장 높은 수준을 보이고 있다. 2012년 새로 발견되어 신고된 결핵 환자 수는 39,545명, 결핵으로 인한 사망자 수는 2,466명으로, 법정 감염병 중 결핵으로 인한 사망자가 가장 많다². 최근에는 결핵 발병률의 증가와 함께 다제내성 결핵균(multidrug-resistant tuberculosis, MDR TB)도 증가하고 있어 큰 위협이 되고 있다. 항결핵제 중 필수 약제인 아이나(isoniazid)와 리팜핀(rifampin)에 내성인 다제내성 결핵(multidrug-resistant tuberculosis; 이하 MDR-TB) 균의 증가가 전 세계적으로 문제가 되고

있으며, 최근에는 다제내성 결핵균 중 Fluoroquinolone 와 2차 항결핵 약제인 kanamycin, amikacin, capreomycin에 내성이 생긴 광범위내성 결핵 (extensively drug-resistant tuberculosis; 이하 XDR-TB) 균이 결핵 퇴치에 큰 위협이 되고 있다. 다제내성 결핵균과 마찬가지로 광범위내성 결핵균도 치료과정 중 내성을 획득하여 출현한다. 다제내성 결핵은 다른 환자에서 전염되는 초회 획득내성과, 불규칙한 투약 때문에 생기는 획득내성으로 구분할 수 있다. 다제내성결핵은 2년 이상의 치료기간이 요구되고 치료비용이 많이 소모됨에도 불구하고 다수의 사망자와 치료실패자가 발생하는 문제가 있다. 그리고 이 치료하기 어려운 결핵균을 다른 사람에게 전파시킬 위험도 더 높다는 것도 큰 문제이다. 이와 같이 약제내성 결핵은 결핵 치료를 위해 중요한 비중을 차지하기 때문에 결핵 치료 시 결핵균 (*M. tuberculosis*; MTB)의 내성이 진행되는 것을 판단하는 것이 매우 중요하다.

WHO는 '2014 Global Report on Surveillance and Response'를 통해서 2013년 전 세계 다제내성결핵 환자는 48만 명으로 결핵신환자의 3.6%정도이며 이중 15만 명이 사망하는 것으로 추정된다고 보고하였다. 그리고

1명이상 광범위내성결핵을 보고한 국가는 58개국이며 다제내성결핵의 10.0%를 광범위내성결핵으로 추정하였다³. 우리나라 질병관리본부의 2013년 결핵환자 신고 현황에서는 결핵 신환자 36,089명 중 다제내성 신고 결핵환자는 951명, 광범위내성결핵 신고 환자는 113명으로 내성결핵환자 비율이 꾸준히 증가되고 있다².

결핵 진단한 방법으로는 결핵의 증상, 흉부 X-선 검사, 미생물학적 진단(항산균도말검사, 항산균배양검사, 결핵균핵산증폭검사, 약제감수성검사), 조직학적 진단, 기타검사(흉부전산화 단층촬영), 면역학적진단(결핵감염검사)등이 이용된다. 결핵은 지방 성분이 많은 세포벽에 둘러싸여 있어 건조한 상태에서도 오랫동안 살 수 있고, 강한 산이나 알칼리에도 잘 견디는 항산성 균으로 그 성질이 다른 세균과 상당히 다르기 때문에 설파민, 페니실린, 그 밖의 일반적인 항생물질은 효과가 없다. 결핵의 치료는 외과적 요법을 병행하는 경우도 있으나, 항결핵제에 의한 화학요법이 주로 이용된다. 결핵의 완치를 위해서는 치료기간이 최소 6개월 이상 소요되며, MDR-TB 환자의 경우 2년 이상의 긴 치료기간이 필요하다. 현재 결핵치

료에 사용하는 항결핵제는 9~10종 정도가 있는데, 이 중 치료효과가 좋고 부작용이 적어 우선적으로 사용하는 항결핵제를 ‘1차 약제’ 이라고 하며, 그보다 효능은 떨어지면서 부작용은 더 심해서 꼭 필요한 경우에만 사용하는 항결핵제를 ‘2차 약제’ 이라고 한다. 이와 같은 항결핵제에 결핵이 사멸하여 치료효과가 있는 경우 감수성 있다고 하며, 어떤 항결핵제에 치료가 되지 않아 결핵이 잘 죽지 않는 경우 해당 약에 대해 내성이 있다고 말한다. 즉 항생제 감수성 검사란 항결핵제에 결핵이 반응하는 정도를 의미한다. 임상적으로 활동성 결핵이 의심되는 환자의 결핵환자의 초기 치료는 항결핵제에 감수성이 있다는 가정하에 1차 항결핵제인 아이나(isoniazid, INH), 리팜핀(rifampin, rifampicin, RIF)과 함께 에탐부톨(ethambutol, EMB) 그리고 피라진아미드(pyrazinamide, PZA) 등 4가지 약제를 병합하여 2개월간 치료한 뒤, 이후 4개월 동안 INH, RIF 또는 INH, RIF, EMB로 치료하는 2HRZE/4HR(E) 방법을 사용하고 있다. 항결핵제결핵에 대한 치료 알고리즘은 그림1과 같다(figure1). 초기치료 약제 중 PZA는 초기 염증성 병변과 건락성 괴사 부위와 같이 산성 조건 하에 존재하는 결핵균에 대한 사멸효과가 뛰어나 결핵의 초기 치료에 적극 권

고되며, 치료 기간을 단축시키는데 중요한 약제로 사용된다. 그러나 간독성과 관절염, 고요산혈증 등의 부작용을 유발하며 따라서 이러한 부작용으로 인해 일반적으로 결핵 치료 초기에 2개월만 이용된다⁴. 그 밖의 부작용으로 streptomycin과 kanamycin에 의한 청력장애와 평형감각장애, ethionamide에 의한 위장장애, cycloserine에 의한 경련, 정신이상, ethambutol에 의한 시력장애나 말초신경염 등이 있어 있다. INH, RIF 경우 부작용이 상대적으로 덜하며 초기 치료와 MDR-TB 환자와 같이 2년 이상의 긴 치료 기간 시에도 이용되어 결핵균 치료를 위한 중요약제라 할 수 있다. 따라서, 결핵균의 1차 약제인 INH, RIF에 대한 항결핵제 감수성 결과를 파악하고 적절한 항결핵제를 선택하여 결핵치료를 하는 것이 매우 중요하다. 그러나 임상환자의 경우 항결핵제 감수성검사결과 INH, RIF에 감수성 이었으나 환자의 불규칙한 투약에 등에 의한 원인으로 실제 약이 듣지 않아 내성으로 이완되는 경우가 있으며, 항결핵제 내성으로 이완되더라도 약제 감수성 결과는 1~2개월이 소요되어 2차 약제 치료시기가 늦어져 결핵치료에 어려움이 있다. 결핵 퇴치를 위해 큰 위협이 되고 있는 내성결핵치료를 위해 약제감수성 검사 이외에 신속히 내성결핵이완

을 진단할 수 있는 검사학적 방법을 마련하는 것이 매우 시급하다.

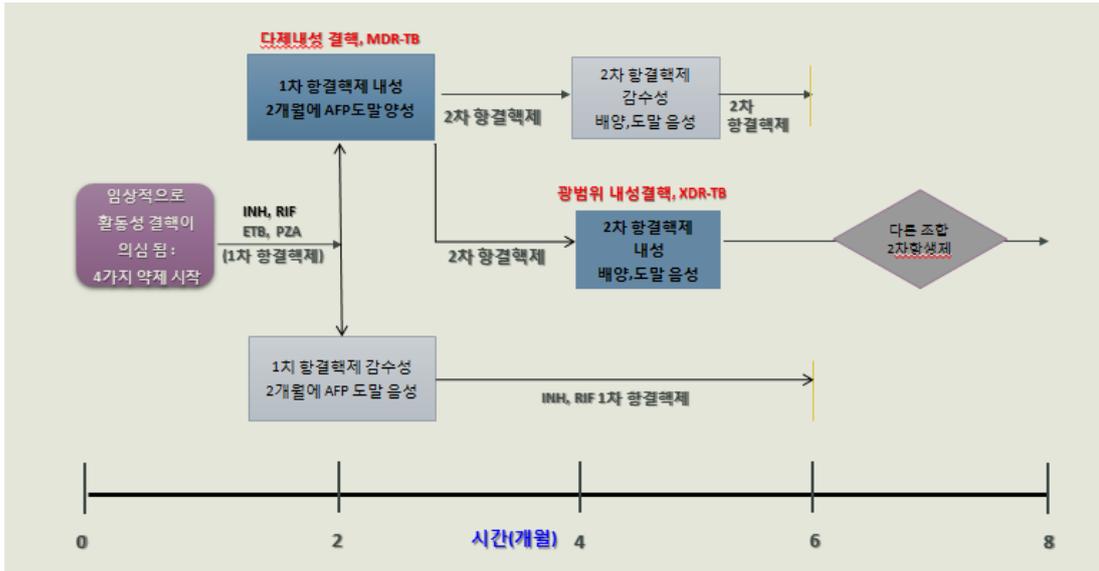


Figure1. Algorithm for treatment of *Mycobacterium tuberculosis*.

최근 결핵에 대한 신속 진단 방법이 많이 개발되었지만 결핵의 진단에서 배양한 결핵균의 항산성염색 도말검사가 차지하는 비중은 여전히 높다. 결핵균 배양은 결핵을 확진하는 데 필수 적이나 시간이 오래 걸리는 것이 단점이다. 결핵배양과 함께 결핵이 늦게 자라는 특성 때문에 2개월에 한번씩

검사 항산성염색 도말검사와 항결핵제 감수성검사와 거치게 되는데 배양된 결핵균의 항산성 염색 도말검사 시 결핵균은 특유한 실타래 모양으로 생장하는 것을 관찰 할 수 있다. 이를 결핵균삭형성(cord formation)이라 한다 (figure2). 결핵균삭은 결핵균의 지질 표면에 존재하는 트레할로오스(trehalose-6,6'-dimycolate ; TDM)에 의한 것으로 트레할로오스(trehalose)와 2분자의 미콜산(mycolic acid)의 에스테르 축합물로 구성되어 있으며, 이 cord factor가 독성결핵에 주요 역할을 담당한다

Middlebrook은 균삭형성을 '독성결핵의 주요요소'로 설명하였으며⁴, Bloch와 Noll은 이 'cord factor' 인 TDM이 결핵균의 독소 정도와 밀접한 관계가 있음을 다음과 같은 증거로 밝혀냈다⁴⁻⁷.

(1) TDM은 결핵균이 생산하는 가장 풍부하고 가장 독성을 가지고 있는 지질이다. 결핵은 인간 절대 기생물로써, 결핵의 모든 요소는 인간에게서 생존을 촉진시키기 위해 진화되었다.

(2) TDM은 비 독성 결핵에 비해 독성 결핵 표면에서 더 많이 추출 할 수 있다.

(3) 쥐를 이용한 실험에서 결핵으로부터 TDM을 제거하면 진행성 감염을 일으키는 능력이 없어진다.

(4) 독성의 원인이 되는 아주 적은 양의 TDM을 쥐에게 주입한 경우, 급성 및 만성 결핵으로 발전하여 다량 감염과 같이 더 빨리 사망한다. 따라서 균삭 형성을 통해 독성 결핵의 존재 유무를 확인 할 수 있다.

Robert L. Hunter도 결핵균의 지질표면에 존재하는 TDM 의해 결핵균의 집락 모양에 변화가 생길 뿐 아니라, TDM이 결핵균의 여러가지 항생제에 대한 자연내성의 원인이 되는 물질로 결핵균의 생물학적 활동변화의 주요 원인을 증명했다⁷. 이러한 독성결핵의 주요원인과 관계된 TDM에 의한 균삭 형성은 항산성염색 도말검사로 그 형태학적 특징을 현미경상에서 확인할 수 있지만, 균삭형성과 관련한 연구는 쥐나 돼지 등 포유류 동물대상 연구로 국한되어 있어 인간에서 분리된 결핵의 균삭형성에 대한 연구는 매우 부족한 현실이다.

2. 연구 목적 :

본 연구의 목적은 결핵 균삭 형성과 항결핵제 내성과의 연관성을 파악하여 신속한 내성결핵 이완을 예비진단 할 수 있는 검사학적 기초자료를 만드는 것이다.

세부적 목적은 다음과 같다.

- 1) 결핵균삭이 형성된 군과 미 형성된 군을 구분하고 결핵1차 약제 약제인 Isoniazid(INH)와 Rifampicin(RIF)약제 감수성 결과를 비교하여 연관성을 밝힌다.
- 2) 결핵 균삭 형성을 확인하여 신속한 내성결핵 이완 진단의 검사학적 방법을 마련한다.
- 3) 결핵균삭의 독성에 대한 인간대상 연구 자료 마련한다.

본 연구에서는 결핵균삭에 대한 문헌연구를 바탕으로 인간에서 분리한 결핵균의 균삭형성이 독성과 어떠한 연관성이 있는지 확인해보았다. 실제로 연구표본을 선행 조사한 결과 항결핵제 복용이력이 없는 환자에게서 분리된 독성결핵의 경우 항산성 염색 도말에서 균삭 형성을 보이다가 항결핵제 중 1차 약제인 INH와 RIF 치료를 진행하면 감수성이 있는 경우 균삭형성이 보이지 않았다. 그러나, 진단 초기에 항결핵제 내성검사에서 감수성으로 보

고 되었으나, 균삭 형성을 계속적으로 보이는 경우, 추후 내성결핵으로 이완되는 것을 관찰하였다. 또한, 내성 결핵환자가 균삭형성을 보이다가 2차 항결핵제 복용 시 이 항결핵제에 감수성이 있을 경우 다시 균삭형성이 보이지 않았다. 이에 결핵 균삭 형성과 항결핵제 내성과는 연관성이 있다는 가설하에 본 연구를 진행하여 결핵독성에 관계된 균삭형성(cord formation)이라는 현미경상의 형태학적 특징을 항산성 염색 도말로 확인하고 결핵약제 내성과 연관성을 알아보았다.

3. 용어의 정의

1) 배양양성검체(culture-positive): 액체배양성사에서 결핵 양성으로 확인된 검체.

2) 균삭형성검체(code formation): 액체배양 결핵균 양성이면서 균삭을 형성한 검체.

3) 균삭무형성검체(non-code formation): 액체배양 결핵균 양성이면서 균삭을 형성하지 않은 검체.

II. 연구 방법

1. 연구 대상

2012 년 5 월부터 2013 년 12 월까지 삼성서울병원에서 결핵균이 동정된 환자 총 583 건을 대상으로, 환자 검체에서 분리된 결핵균을 액체 배양하여 항산성염색 도말검사와 항결핵제 약제내성검사를 실시하였다. 항산성 염색 도말검사서 균삭 형성된 균과 미형성 균을 구분하고 결핵 1 차 약제 내성 검사결과(Isoniazid[INH], Rifampic RIP) – 결핵연구원 [KIT];절대농도법)를 비교하였다. 또한 연구 대상의 전자의무기록을 토대로 흡연, 당뇨병, 고혈압, 간염, 과거 결핵 치료력과 같은 환경 및 생태학적 요인을 파악하여 기존에 밝혀진 결핵발생의 주요한 영향요인을 본 연구를 통해 다시 한번 확인해보고, 내성결핵발생에 영향을 미치는 요인을 추가적으로 규명하기 위한 시도를 하였다.

2. 결핵균 배양검사

1) 검체종류: 결핵균 배양을 위한 검체는 객담이나 기관지 세척액 등 호흡기 검체가 가장 많고, 조직, 뇌척수액, 흉수, 복수, 관절액 등 체액 그리고 소변, 대변 등으로도 이루어 졌다.

2) 배양균 도말검사: 일반적으로 결핵균 배양 전 객담도말 검사를 시행하는데, 도말(塗抹)'이란 가래나 혈액 등의 체액을 슬라이드 글라스(slide glass)등에 얇게 펴서 바른다는 뜻이다. 객담 도말검사는 결핵이 의심되는 환자에서 결핵균의 배출여부를 확인하기 위해 환자 검체를 슬라이드 글라스에 얇게 펴서 바른 후 염색을 하여 현미경으로 결핵균의 존재여부를 확인하는 검사법이다. 본 연구에서 말하는 항산성 객담 도검사는 결핵배양양성 검체를 동정검사 시 실시하는 항산성도말 염색법을 말한다.

3) 결핵균 배양 검사: 최근 결핵에 대한 신속 진단 방법이 많이 개발되었지만 결핵의 진단에서 배양한 결핵균의 항산성염색 도말검사가 차지하는 비중은 여전히 높으며 결핵의 확진은 결핵균의 배양 및 동정에

의한다. 결핵균 배양 검사는 환자 검체를 균이 잘 자랄 수 있는 환경에서 키워서 결핵균이 자라는지 확인하는 검사이다. 결핵균은 매우 느리게 증식하고 오랜 배양기간이 필요하기 때문에 결핵균배양검사를 통해 균의 존재여부를 확인하는데 보통 2~8 주 정도의 시간이 소요된다. 객담배양검사에 이용되는 배지는 크게 고체배지와 액체배지 두 종류로 나눌 수 있다. 액체배지는 최근에 사용되는 방법으로 2 주 정도가 지나면 결핵균의 배양 여부를 알 수 있고 고체배지에 비해 결과가 빠르게 나오며 양성률이 높은 장점이 있다. 이에 비해 고체배지는 오래 전부터 사용하던 방법이라 안정적이고 고체배지에서만 결핵균이 자라는 경우도 있지만, 결핵균의 배양 여부를 확인하기 위해 3~8 주의 오랜 시간이 걸리고 일부 항산균이 증식할 수 없다는 단점이 있으며 균삭형성을 확인하기가 어려워 본 연구 대상에서는 제외하였다. 결핵균 배양에 주로 이용되는 객담과 같은 호흡기 검체는 객담이 점조도가 높고 결핵균 이외의 다른 상재균이 많이 존재한다. 오염된 부위에서 채취된 검체는 오염균을 제거하기 위해 적절한 액화 및 오염제거 과정을 거치는데 본 연구에서는 N-acetyl-L-cysteine-2% sodium hydroxide(NALC-NaOH)법이 이용되었다. 오염균

제거가 완료된 검체는 BD BACTEC™ MGIT™ 960 System 을 이용하여 액체배지에서 6 주 배양했다. BACTEC MGIT 전용 Growth Supplement 는 Bovine albumin, Dextrose, Cabalse, Oleic acid, polyxyethylene state(POES)이며, 잡균 제거를 위해 Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, Azlocillin 을 첨가하였다. BACTEC MGIT detection 원리는 Fluorescent 법이 이용되며 배양된 액체 배지에 결핵균이 존재할 경우 결핵균이 소비하는 산소의 감소변화를 형광센서로 관측한다.

3. 항산성도말검사 및 균삭형성 확인

1)형광염색법- 결핵균은 세포질내 지질이 많아서 일반 염색 시약으로 잘 염색되지 않지만 형광염색에서 auramine-rhodamine 같은 arylmethane염료에 일단 염색되면 강한 산에도 탈색되지 않는다. 조직에서 결핵균은 0.4 x 3 μ m의 곧은 막대모양을 보이나 액체배양을 하면결핵균은 원형이나 섬유질 모양등 다양한 형태를 보인다. 액체 배양된 결핵균을 형광염색하여 UV를 이용한 형광현미경으로 저배율(250배)에서 30시야를 관찰하면 노란색 형광을 나타내는 약간 굽었거나 곧은 막대균을 확인할 수

있으며, 균삭형성(Serpentine cord formation)시 실타래 모양을 보인다.

형광염색법은 결핵균을 관찰하는 스크리닝 검사로 이용된다.

2)Ziehl-Neelsen염색법- 결핵균 고지질층 세포벽에 열을 가해 carbofuchin 염료를 침투시켜 고정한 후 Acid-alcohol로 염료를 탈색하는데 결핵균의 세포벽의 고지질층 성분이 탈색을 방지 한다. Methylene Blue로 대조 염색하면 결핵균은 처음 염색한 염료가 그대로 남아 있어 유침렌즈에서 고배율(1000배)로 관찰하면 붉은색 결핵균삭을 확인 할 수 있다. Ziehl-Neelsen염색법이 항산성 도말검사의 확인법이다.

4. 결핵균 동정

분자생물학적검사(결핵균 핵산증폭검사, PCR): 결핵균 DNA 를 추출하여 결핵균의 존재여부 및 그 종류를 확인하는 검사법이다. 결핵균에만 특이적으로 존재하는 RD(Region of Difference)유전자 부위(M, A Behr et al. Science 284, 1999)가 표적이므로 MTB complex(*M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*)가 아닌 MTB 만을 검출하며, MTB 를

포함한 Mycobacteria 에 공통으로 존재하는 *rpoB* 유전자 부위에 동시에 증폭하여 결핵균(*M. tuberculosis*) 및 비결핵항산균(Nontuberculosis mycobacteria: NTM)을 구분해 낼 수 있다. NTM 에서도 일부 균삭형성을 보이기도 하나 결핵균 본 연구대상에서는 제외하였다. 분자생물학적검사는 객담도말검사나 배양검사를 대체할 수 없으나, 보조적인 진단방법으로 이용할 수 있다.

5. 약제감수성 검사

약제감수성이란 결핵균이 어떤 결핵약에 잘 죽고, 어떤 결핵약에 잘 죽지 않는지(감수성 없음/해당 약에 대해 내성이 있음) 반응하는 정도를 의미한다. 객담배양검사를 통해 결핵균이 배양되면, 검사실에서는 배양된 균에 여러 종류의 항결핵제를 각각 투여하여 어떤 종류의 약에 대해 감수성(Susceptible: S)이 있고 어떤 종류의 약에 대해 내성(Resistant: R)여부를 테스트 하게 되는데, 이것을 약제감수성검사라고 한다. 본 연구에서는 1 차약제인 INH, RIP 에 대한 결핵연구원 약제감수성검사 자료를 이용하였다(절대농도법).

6. 통계분석

1) 연구대상자의 결핵발생 위험 질환별 분포.

자료의 통계처리는 Statistical Analysis System(SAS 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)통계프로그램을 이용하여 분석하였다. 모든 통계분석의 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 실시하였다. 연구 대상자의 결핵발생 위험 요인 별 분포를 파악하기 위해 후향적 코호트 설계를 통해 설정한 코호트 중 결핵이 확진된 환자의 전자의무기록을 전수 조사하여 질환력을 파악하였다. 결핵발생 주요 위험 요인인 당뇨와 고혈압의 경우 질환 과거력 및 현재 환자를 포함한 대상자를 설정하였으며, 간염의 경우 치료가 완치되어 혈액학적 소견이 정상인 경우 질환력에서 제외하였다. 둘째, 동일 환자에게서 분리된 검체에서 중복으로 결핵이 동정되었다 하더라도 발생건수는 1회만 산정하였다. 셋째, 결핵발생 위험 질환분포를 균삭형균과 비형성 균삭형성균으로 나누어 각 변수간 연관성 유무를 chi square test로 확인 하였다.

2) 균삭형성과 항결핵제 내성

연구 대상자를 균삭형성균과 비형성균으로 나누고 일차 항결핵제인 아이나(Isoniazid)와 리팜핀(Rifampicin) 약제 감수성 결과와 균삭형성 유무를 비교 분석한 후 결핵발생 위험 질환 중 균삭형성에 영향을 미치는 변수인 당뇨를 보정하여 항결핵제 내성과의 연관성을 확인 하였다.

Ⅲ. 결과

1. 연구대상 개요

2013년 1월부터 12월까지 삼성서울병원에서 결핵균이 동정된 환자 검체는 총 583건이었다. 남성이 344명으로 59.0%, 여성이 239명으로 41.0%를 차지하였으며 남성이 여성보다 18.0% 더 많았다(table1). 2010년 질병관리본부의 결핵정보감시체계에 신고된 신환자 자료에서도 남자가 여자보다 높은 신환 신고율을 보여 주었으며 과거 10년간의 성별 신고환자율에서도 남자가 지속적으로 높은 추세를 유지하고 있는 것과 일치하였다⁴⁰. 이는 남성의 직장생활과 같은 집단생활에의 노출빈도가 여성보다 높기 때문이라는 사회적인 관점에서 추측해볼 수 있는데, 성별에 따른 사회, 경제적 역할과 활동이 결핵균 노출 정도에도 차이를 보여주며, 질병에 대한 남자와 여자의 반응형태가 틀리고, 남자보다 여자의 경우 결핵의 조기 발견 및 치료가 더욱 어렵다는 것을 보여주고 있는 많은 연구가 이러한 사실을 뒷받침해주고 있다⁴¹. 평균 연령은 남성은 56.82 ± 16.05 , 여성은 52.00 ± 20.05 세로 남성이 조금 더 높았다.

흡연력에서 흡연을 전혀 하지 않는 비흡연자의 비율이 56.64%였으며 남성은 26.6%인 반면 여성은 94.2%가 흡연을 한 적이 없었다. 과거 2개월 이상 금연한 흡연한자(Ex-smoker)는 22.99%이었지만 남성은 그 비율이 35.69%로 여성의1.262%보다 높았다. 현재 흡연자 또는 2개월 미만 금연자는 20.37%였으며 남성이 37.71%로 높은 흡연율을 나타냈다. 흡연력에 따른 결핵발생률이 경우 비흡연자 보다 과거 혹은 현재 흡연력이 있는 대상자에서 결핵 발생률이 높다는 기존연구와 일치하였다⁴⁰. 진료기록 작성을 위한 예진 시 설문조사에 응답한 정확도 조사는 이루어 지지 않았으므로 비흡연자의 일부는 흡연자였을 가능성을 배제할 수 없다.

당뇨병에 걸린 사람이 걸리지 않은 사람들에 비해 결핵발생 위험이 2~3배 높으며 결핵의 치료 결과에도 역효과를 초래한다고 보고된 바 있다⁴². 당뇨병력의 경우 연구 대상자의 15.51%가 당뇨환자로 확인 되었으며 남성이 높은 비율을 차지 하였다. 당뇨병을 앓고 있지만 성공적으로 혈당을 조절이 이루어 진다 하더라도 결핵발생률이 정상인보다 증가하므로⁴⁰ 치료를 통해 혈당을 조절하고 있는 상태라 하더라도 당뇨로 질병분류가 되어있는 경우 당뇨환자에 포함하였다. 84.49%가 당뇨환자가 아닌 것으로 나타났으

며, 남녀별로는 각각 78.87%와 92.44%로 당뇨병력이 없는 여성의 비율이 높았다.

고혈압력의 경우 연구 대상자의 23.30%가 고혈압 환자였으며 남성이 높은 비율을 차지하였다. 당뇨병과 마찬가지로 진료기록 당시 치료를 통해 혈압을 조절하고 있다 하더라도 고혈압으로 질병분류가 되어있는 경우 고혈압 환자에 포함하였다. 76.60%가 고혈압 환자가 아닌 것으로 나타났으며, 남녀별로 73.00% 81.93%로 고혈압력이 없는 여성의 비율이 높았다.

음주력에 따른 결핵발생률은 음주군과 비음주군을 비교하였을 때 전혀 음주를 하지 않는군에 비해 음주군이 결핵 발생률이 낮아지는 결과가 있다는 기존 연구가 있으나⁴⁰ 진료기록상 음주량에 대한 응답의 정확도가 떨어져 분석에서 제외 하였으며 추가 조사가 필요하다.

기타 기저질환으로 간염의 경우 조사대상 6.10%가 간염환자로 남녀의 비율이 크게 다르지 않았다. AST비정상군이 정상군보다 결핵 발생 위험률이 높고 ALT 이상군은 정상군보다 위험률이 낮으므로⁴⁰ 간염 치료가 완료되어 AST, ALT, γ GT 등 혈액학적 소견이 변화가 없는 경우 간염력에 포

함하지 않았다. 간염에 대해 남녀 별로 91.07%, 97.90%가 정상으로 여성의 비율이 조금 더 높았다

Table 1. Characteristics of study group.

	Male		Female		Total	
	n	%	n	%	n	%
Age(mean±SD)	344	56.82±16.05	239	52.00±20.05	583	100.00
Smoking						
Never	79	26.60	224	94.20	303	56.64
Current	112	37.71	11	4.62	123	22.99
Ex-smoker	106	35.69	3	1.26	109	20.37
DM	71	21.13	18	7.56	89	15.51
Hypertension	91	27.00	43	18.07	134	23.30
Hepatitis	30	8.93	5	2.10	35	6.10
TB treatment history	46	13.69	26	10.92	72	12.54

4. 균삭 형성률

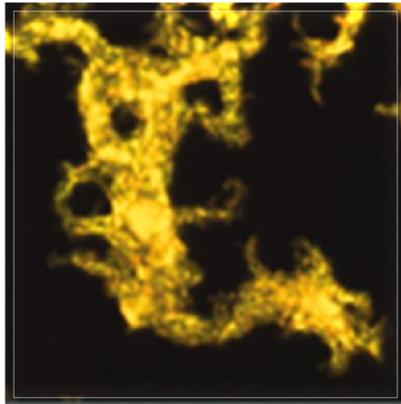
1) 연령별 균삭형성 분포

조사대상 검체 총 583건에 대한 환자의 전자의무기록을 전수 조사하였다. 일반적으로 결핵이 의심되는 환자의 경우 결핵 검출률을 높이기 위해 2~3회에 걸쳐 시간차를 두고 검체를 중복 채취하여 액체배양검사를 시행한다. 이때 동일환자에게서 분리된 검체에서 결핵균이 중복으로 검출되었다 하더라도 하나의 검체 만이 질병관리본부로 의뢰되어 항결핵제내성검사가 시행된다. Jung의 연구에서⁴³ 는 환자의 항결핵제내성검사 결과를 중복검체에 적용시켜 약제내성과 균삭 형성률의 연관성을 파악하였으나, 통계적 오류를 줄이고자 항결핵제 내성검사가 이루어진 검체를 일대일 파악하여 통계분석에 이용하였다. 조사대상 중 결핵 균삭형성(cord formation)균의 평균연령은 54.0 ± 17.7 세였으며, 균삭비형성(non-code formation)균 55.3 ± 18.1 으로 큰 차이가 없었다. 연령군별로는 결핵균삭을 형성한 그룹은 71~80세군이 22.56%를 차지하여 가장 높았으며 그 다음으로는 51~60(21.28%)세 연령군, 61~70(16.92%)세 연령군 구성이 다수를 차지하였다. 균삭비형성균의 경우 51~60세 연령군이 42.21%를 차지하여 가장 높았으며 71~80(18.75%)세 연령군, 61~70(16.15%)세 연령군 순으로 균삭 형성군과 비형성군사이에 연령별 차이는 크지 않았다(table2).

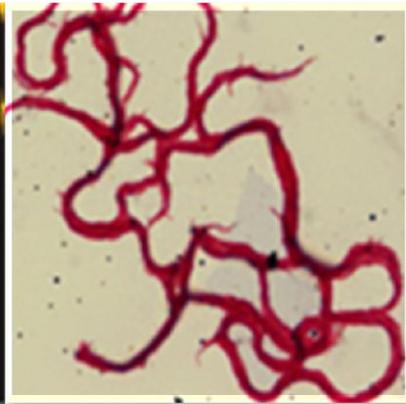
Table 2. Cord formation in TB patients by age.

	Cord formation (n=192)	non-cord formation (n=391)	<i>p</i> value
0~20	14(3.59%)	4(2.08%)	
21~30	32(8.21%)	24(12.50%)	
31~40	40(10.26%)	20(10.42%)	
41~50	54(13.85%)	27(14.06%)	
51~60	83(21.28%)	42(21.88%)	
61~70	66(16.92%)	31(16.15%)	
71~80	88(22.56%)	36(18.75%)	
81~	13(3.33%)	8(4.17%)	<i>p</i> =0.70*
total	192(100%)	391(100%)	

* chi square test

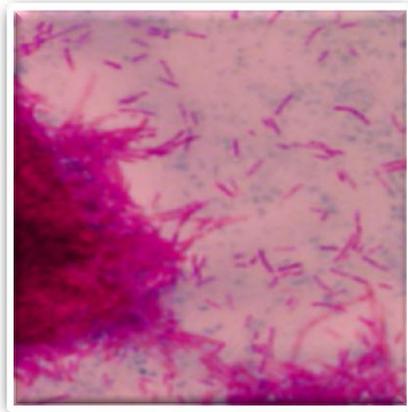


Fluorescence stain



Ziehl-Neelsen stain

a : Cord formation



b : Non-cord formation

Figure2.

a: Cord-formation of tuberculosis bacilli in Acid-fast stain(x 100)

b: Non-cord formation of tuberculosis bacilli in Acid-fast stain(x 1000)

3. 균삭형성과 1차약제 내성

결핵균이 검출된 검체 583건 중 균삭형성이 된 경우는 192건으로 33.0%였다. Isoniazid(INH)와 Rifampin(RIF)의 감수성검사 검체 전체 비율은 각각 항결핵제에 대하여 감수성/감수성(S/S) 505건(86.6%), 내성/감수성(R/S) 40건(6.9%), 내성/내성(R/R) 37건(6.3%), 감수성/내성(S/R) 1건(0.2%)이었다. 균삭 무형성 군에서의 INH와 RIF의 감수성 검사는 S/S 361건(92.38%), R/S 16건(4.1%), R/R 13건(3.3%), S/R 1건(0.3%)건이었으며, 균삭형성군의 감수성 결과는 S/S 144건(75.00%), R/S 24건(12.5%), R/R 24건(12.5%)으로 균삭형성군에서 INH, RIF 내성 비율이 높았다(table3).

Table3. Cord formation in TB patients by drug resistance.

	Susceptible		Resistant		Total
	S/S	R/S	R/R	S/R	
cord	144	24	24	0	192
(n=192)	(75%)	(12.5%)	(12.5%)	(0%)	(100%)
non-cord	361	16	13	1	391
(n=391)	(92.38%)	(4.1%)	(3.3%)	(0.3%)	(100%)

S/S: susceptible to INH, RIF

R/S: resistant to INH, susceptible to RIF

R/R: resistant to INH, RIF

INH중심으로 감수성 결과를 비교해 보면 균삭형성균에서 감수성은 75.00%(144/192), 내성이 25.00%(48/192)이었으며, 균삭 비형성균에서는 감수성 92.58%(362/391), 내성이 7.42%(29/391)으로 균삭 형성균에서 INH 내성비율이 통계학적으로 유의하게 높았다 ($p < 0.0001$)(table 4).

Table 4. Isoniazid(INH) resistance in cord and non-cord TB bacilli.

	Cord N(%)	Non-cord N(%)	Total
INH susceptible	144 (75)	362 (92.58)	506(100)
INH resistant	48 (25)	29 (7.42)	77(100)
	192 (100)	391 (100)	583(100)

$P < 0.0001$ (chi square test)

kappa coefficient = 0.2075 (95% CI; 0.1309, 0.2840)

RIF경우 균삭 형성균은 감수성 87.50%(168/192), 내성 12.50%(24/192)이었으며 균삭 비 형성균에서는 감수성 96.42%(377-391), 내성 3.58%(14/391)으로 RIF 내성 비율도 균삭 형성균에서 통계적으로 유의하게 높았다($p < 0.0001$)(table5).

Table5. Rifampin(RIF) resistance in cord and non-cord TB bacilli.

	Cord N(%)	Non-cord N(%)	Total
RIF susceptible	168 (87.50)	377 (96.42)	545(100)
RIF resistant	24 (12.50)	14 (3.58)	38(100)
	192 (100)	391 (100)	583(100)

$P < 0.0001$ (chi square test)

kappa coefficient = 0.1121 (95% CI; 0.0498, 0.1743)

4. 질병력에 따른 균삭형성 분포.

결핵치료 1차 약제인 INH, RIF 내성 이외에 조사 대상균의 생태학적 요인에 의해 균삭형성 분포가 달라지는지 확인하기 위하여 질병력에 따른 균삭형성과의 연관성을 평가해 보았다. 최근까지 밝혀진 결핵발생요인의 위험 요인은 생물학적 요인과 환경 및 생태학적 요인으로 나뉘는데 인종, 성별과 같은 유전 및 생물학적 요인과 흡연, 음주, 생활습관, 거주환경, 소득수준, 교육수준, HIV감염, 당뇨병, 고혈압, 영양상태, 암 등과 같은 환경 및 생태학적 요인이 결핵발생의 위험요인으로 파악되고 있다. 전자환자기록을 조사하여 당뇨, 고혈압과 같은 결핵발생의 대표 위험요인과 간염과 같은 기저질환 그리고 과거 결핵치료력을 중심으로 균삭형성과의 연관성을 확인해 보았다. 당뇨력에 따른 균삭형성률의 경우 균삭형성균에서 19.90%로 비형성균 3.32% 보다 높으며 당뇨력과 균삭형성률 사이에 통계적으로 유의한 결과를 보였다($p=0.04$). 고혈압의 경우 균삭형성균에서 21.99%, 비형성균에서 23.96%로 큰 차이를 보이지 않았으며 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.6$). 간염력에서는 균삭형성균에서 7.33% 균삭비형성균에서 5.48%로 유의한 차이는 없었으며($p=0.38$), 과거

결핵치료력에 따른 균삭형성률을 보면 균삭형성균 15.1%, 균삭비형성균 11.23%로 균삭형성균에서 3.87% 높았으나 통계적으로 유의한 관계를 보이지는 않았다($p=0.18$). 흡연력에 따른 균삭형성률의 경우 균삭형성균과 비형성균 간에 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.34$). 흡연을 전혀 하지 않는 비흡연자 중 균삭형균의 비율이 55.62%였으며 균삭비형성균은 57.14%이었으며 현재 흡연자 또는 2개월 미만 금연자는 균삭형성균이 17.98%로 균삭비형성균 21.57%에 비해 3.59% 낮았다. 과거 2개월 이상 금연한 흡연한자(Ex-smoker)는 균삭형성균이 26.40%로 균삭비형성균의 21.57% 보다 4.83% 높았다(table 6).

Table6. Cord formation in TB patient by disease and smoking status.

		Cord n(%)	Non-cord n(%)	Total n(%)	<i>p</i> ** <i>-value</i>
DM*	yes	38 (19.90)	51 (13.32)	574(100)	0.04
	no	153(80.10)	332(86.68)		
Hypertension	yes	42 (21.9)	92 (23.96)	575(100)	0.6
	no	149(78.01)	292(76.04)		
Hepatitis	yes	14 (7.33)	21 (5.48)	574(100)	0.38
	no	177(92.67)	362(94.52)		
TB treatment history	yes	29 (15.18)	43 (11.23)	574(100)	0.18
	no	162(84.82)	340(88.77)		
Smoking status					
	Never smoker	99(55.62)	204(57.14)		
	Current smoker	32(17.98)	77(21.57)	535(100)	0.34
	Ex-smoker	47(26.40)	76(21.29)		

*diabetes mellitus

**chi square test

항결핵제 내성과 통계적 유의성을 보이는 균삭형성에 당뇨가 혼란변수 (confounder)로 작용하는지 확인하기 위해 조사대상을 당뇨력이 있는 군과 없는 군으로 나누고 항결핵제 내성과 균삭형성과 연관성을 확인해 보았다.

당뇨력이 있는군을 먼저 살펴보면 균삭형성군에서 INH 내성분포는 90.20%, 균삭비형성군에서 89.47%로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않으며($p=0.911$), RIF내성분포도 균삭형성군에서 3.92%, 균삭비형성군에서 5.26%로 큰차이를 보이지 않았고 통계적으로 유의하지 않았다 ($p=0.7.625$)(table7).

Table 7. Drug resistance by cord formation in DM

		Cord	Non-cord	Total	p^* -value
		n(%)	n(%)	n(100%%)	
INH	susceptible	5(55.56)	4(44.44)	9(100%)	0.911
	resistant	46(57.50)	34(42.50)	80(100%)	
RIF	susceptible	2(50.50)	2(50.50)	4(100%)	0.7625
	resistant	49(57.65)	36(42.35)	85(100%)	

*chi square test

당뇨력이 없는군에서 균삭형성률과 항결핵제 내성 분포를 보면 INH 내성은 균삭형성군이 92.75%, 균삭비형성군 26.20%로 균삭형성군이 66.55% 더 높았다. RIF내성율도 균삭형성군 96.35%, 균삭비형성군에서 85.62%로 10.73% 더 높았으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p<0.0001$)(table8).

Table 8. Drug resistance by cord formation in non-DM

		Cord	Non-cord	Total	p^* -value
		n(%)	n(%)	n(%)	
INH	susceptible	24(35.29)	44(64.71)	68(100)	<0.0001
	resistant	307(73.80)	109(26.20)	416(100)	
RIF	susceptible	12(35.29)	22(64.71)	34(100)	<0.0001
	resistant	320(70.95)	131(29.05)	451(100)	

*chi square test

IV. 고찰

본 연구는 2013년 1월부터 12월까지 삼성서울병원에서 결핵균이 동정된 환자 검체 총 583건을 대상으로한 후향적 코호트연구이다. 환자검체에서 분리된 결핵균을 액체 배양하여 항산성염색 도말검사와 항결핵제 약제내성 검사를 실시하여 항산성 염색 도말검사에서의 균삭 형성된 균과 미형성 균을 구분하고 결핵1차 약제 내성 검사결과Isoniazid(INH), Rifampicin(RIP)을 비교하였다. 또한 연구 대상의 전자의무기록을 토대로 흡연, 당뇨병, 고혈압, 간염, 과거 결핵 치료력과 같은 환경 및 생태학적 요인을 파악하여 기존에 밝혀진 결핵발생의 주요한 영향요인과 균삭형성 유무에 따른 내성결핵발생에 영향을 미치는 요인을 추가적으로 규명하기 위한 시도를 하였다.

연구대상 총 583명 중 남성이 344명으로 59.0%, 여성이 239명으로 41.0%를 차지하였으며 남성이 여성보다 18.0% 더 많았다. 평균 연령은 남

성은 56.82 ± 16.05 , 여성은 52.00 ± 20.05 세로 남성이 조금 더 높았다. 조사대상 중 결핵 균삭형성(cord formation)군의 평균연령은 54.0 ± 17.7 세였으며, 균삭비형성(non-code formation)군 55.3 ± 18.1 으로 큰 차이가 없었다. 연령군별로는 연령이 증가할수록 결핵발생률도 증가하였으나 균삭 형성군과 비 형성군사이에 연령별 차이는 크지 않았다.

흡연력에서 흡연을 전혀 하지 않는 비흡연자의 비율이 56.64%였으며 남성은 26.6%인 반면 여성은 94.2%가 흡연을 한 적이 없었다고 진료기록을 통해 확인하였다. 과거 2개월 이상 금연한 흡연한자(Ex-smoker)는 22.99%이었지만 남성은 그 비율이 37.1%로 여성의 4.62%보다 높았다. 현재 흡연자 또는 2개월 미만 금연자는 20.37%였으며 남성이 35.69%로 높은 흡연율을 나타냈다. 흡연력의 경우 흡연력에 흡연량이 많을수록 결핵발생 위험도가 증가하는 것으로 보고되었으나 균삭형성군과 비형성군에서 흡연력을

비흡연군(never smoker), 금연한 흡연자(ex-smoker), 흡연자(current smoker)로 구분하였을 때 흡연력에 따른 균삭형성 분포는 크게 차이가 나지 않았으며 통계적으로 유의한 상관관계는 없었다. 여러 문헌에서 음주와 흡연이 결핵발생에 영향을 미치는 것으로 나타났지만 이번 조사에서는 흡연량에 대한 기록과 금연기간, 음주량에 대한 진료기록이 정확하지 않아 이번 조사에서는 분명히 파악하기 어려웠다.

당뇨병력의 경우 연구 대상자의 15.51%가 당뇨환자로 확인 되었으며 남성인 비율을 차지 하였다. 진료기록 당시 치료를 통해 혈당을 조절하고 있는 상태라 하더라도 당뇨로 질병분류가 되어있는 경우 당뇨환자에 포함하였다. 84.49%가 당뇨환자가 아닌 것으로 나타났으며, 남녀별로는 각각 78.87%와 92.44%로 당뇨병력이 없는 여성의 비율이 높았다. 균삭형성군과 비형성군을 비교하였을 때 당뇨환자의 분포가 균삭형성군 19.9%로 비

형성군의 15.32%보다 높았으며 균삭형성과 당노력 사이에 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다($p=0.04$). 균삭형성에 당노력이 혼란변수로 작용하는지 확인하기 위해 조사 대상군을 당노력이 있는 군과 없는 군으로 구분하고 균삭형성율과 isoniazid, rifampin 내성 연관성을 확인해 보았다. 당노력이 있는군을 먼저 살펴보면 균삭형성군에서 INH 내성분포는 90.20%, 균삭비형성군에서 89.47%로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않으며 ($p=0.911$), RIF내성분포도 균삭형성군에서 3.92%, 균삭비형성군에서 5.26%로 큰차이를 보이지 않았고 통계적으로 유의하지 않았다 ($p=0.7.625$). 반대로 당노력이 없는 INH 내성은 균삭형성군이 92.75%, 균삭비형성군 26.20%로 균삭형성군이 66.55% 더 높았으며 RIF내성율도 균삭형성군 96.35%, 균삭비형성군 85.62%로 균삭형성군이 10.73% 높고 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다($p<0.0001$). 결론적으로 당노력이 없는 군에서만 균삭형성과 항결핵제 INH, RIF내성이 유의한 차이를 보여

당뇨력은 항결핵제 내성과는 연관성이 없는것으로 판단된다.

고혈압력의 경우 연구 대상자의 23.30%가 고혈압 환자였으며 남성이 높은 비율을 차지하였다. 76.60%가 고혈압 환자가 아닌 것으로 나타났으며, 남녀별로 73.00% 81.93%로 고혈압력이 없는 여성의 비율이 높았다. 균삭형성균(21.99%)과 비형성균(23.96%) 사이에 고혈압력의 분포는 크게 차이가 나지 않았으며 두 변수간 상관관계는 통계적으로 유의하지 않았다.

기타 기저질환으로 간염의 경우 조사대상 6.10%가 간염환자로 남녀의 비율이 크게 다르지 않았다. AST비정상군이 정상군보다 결핵 발생 위험률이 높고 ALT 이상군은 정상군보다 위험률이 낮으므로⁴⁰ 간염 치료가 완료되어 AST, ALT, γ GT 등 혈액학적 소견이 변화가 없는 경우 간염력에 포함하지 않았다. 간염력 분포는 균삭형성균(7.33%)과 비형성균(5.48%)에서 균삭형성균에서 높았으나 두 변수간 통계적으로 유의하지는 않았다.

과거 결핵치료력력에 따른 균삭형성률을 보면 균삭형성균 15.1%, 비형성균 11.23%로 균삭형성균에서 3.87% 높았으나 통계적으로 유의한 관계를 보이지는 않았다. 과거 결핵초치료시 불규칙한 투약이나 투약중단으로 획득내성이 생길 수 있는데 본 조사 대상균이 초회획득내성의분포가 획득내성보다 어느정도 차이가 나는지에 대한 추후 연구가 필요하다.

본연구의 제한점으로는 첫째, 균삭에 관한 문헌에 따르면 결핵균 검출되었을 때 균삭 형성이 된 경우가 약 90%를 나타낸 것을 볼 수 있었다. 하지만 본 연구에서는 33.3%로 낮은 균삭 형성율을 보인다. 그 결핵배양법이 기존 고체 배양이 아닌 액체 배양법을 이용하였고, 국내 진료 지침, 검사시기 및 내성 결핵 검체가 포함되어 문헌과 차이점이 있는 것으로 판단되나 정확한 근거를 찾는 데는 추가적 연구가 필요하다. 둘째, 전 균삭형성된 균에서 내성이완을 검증하지 못하였다는 것이다. 균삭미형성된 균에 비해 균

삭형성된 균이 1차 항생제 내성비율이 높기는 하였지만 전체 균삭형성된 균에 내성이완이 확인된 것은 아니기 때문에 좀더 많은 환자를 대상으로 연구가 진행 중이다. 다른 제한점으로는 결핵 초치료가 6-9개월 소요되고 다제내성결핵인 경우 보통 18-24개월로 매우 길 기간을 치료 하게 되는데 연구 대상자의 조사기간이 상대적으로 짧아 내성진행과 균삭형성과 연관성을 확인 하기 위한 complete data를 구하지 못했다는 점이다. 기존 연구를 기초자료로 하여 장시간 추적 데이터를 이용한 연구가 필요하다.

이번 연구는 인간대상 결핵균삭형성에 관한 첫 번째 논문이라는 점에 큰 의의가 있다. 과거 결핵독성과 관련된 균삭형성에 대한 연구는 쥐나 돼지와 같이 포유류 연구에 국한되어 있었으나, 1차 항결핵제인 INH RIF 내성과 관련된 연구는 진행되지 않았다. 항결핵제 내성 이완과약이 중요한 이유는 최근 결핵발병률의 증가와 함께 다제내성 결핵균(multidrug-

resistant tuberculosis, MDR TB)도 증가하여 큰 위협이 되고 있기 때문이다. 다제내성 결핵은 다른 환자에서 전염되는 최회획득내성과 불규칙한 투약 때문에 생기는 획득내성으로 구분 할 수 있는데, 이 두가지 경로에 의한 약제 내성 비율은 다제내성 결핵 퇴치를 위해 매우 중요한 비중을 차지하고 있다. 최회내성결핵의 발생은 다제내성 결핵균 자체의 전염력에 의해 좌우된다고 설명되고 있지만, 항결핵제 감수성 결핵과 다제내성결핵균의 전염력에 대한 이전의 연구들은 아직까지 일치된 결론을 얻지 못하고 있다⁴⁴⁻⁴⁷. 그러나 항결핵제 내성으로 이완되더라도 약제 감수성 결과는 1~2개월이 소요되어 2차 약제 치료시기가 늦어져 결핵치료에 어려움이 있다. 따라서, 결핵 퇴치를 위해 큰 위협이 되고 있는 내성결핵치료를 위해 약제감수성 검사 이외에 신속히 내성결핵이완을 진단하여 있는 검사학적 방법을 마련하는 것이 매우 시급하다.

V. 요약 및 결론

항산성염색 도말검사 시 균삭형성이 나타나는 경우와 무형성을 구분하고, 동정된 결핵균에 대해 1차 약제 검사감수성 검사 결과를 비교하였을 때 균삭형성과 약제 내성과 일정한 연관성이 있는 것을 확인하였다. 균삭이 형성되지 않은 균에 비해 균삭이 형성된 균에서 결핵 1차 항결핵제인 아 니나 (Isoniazid) 리팜핀(Rifampin) 내성비율이 통계적으로 유의하게 높았다. 본 연구 결과를 통해 균삭 형성 유무에 따른 감수성 검사만으로 결핵균의 내성 확률을 판단하기는 어렵지만 항산성염색 도말법으로 균삭형성을 신속히 확인하여 장시간 소요되는 항결핵제 약제감수성검사 결과가 나오기 전, 내성 결핵이완을 예비진단 할 수 있는 검사학적 방법으로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

VI. 참고 문헌

1. WHO Report 2012. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO/HTM/TB/2006362. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.
2. 2013결핵환자 신고현황연보
3. 결핵진료지침, 2011
4. Middlebrook G, Dubos G, Pierce C. (1947). "Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli." J Exp Med ;86:175-84.
- 5 Bloch H. (1955). "Virulence of mycobacteria." Adv Tuberc Res. ; 6:49-61.
6. Bloch H, Noll H. (1955). Studies on the virulence of tubercle bacilli. The effect of cord factor on murine tuberculosis. British J Exp Path. ; 36:8-17.
7. Robert L. Hunter. (2009). "TB Research at UT-Houston – A review

of cord factor: new approaches to drugs, vaccines and the pathogenesis of tuberculosis." *Tuberculosis (Edinb)*. December ; 89(0 1): S18–S25.
doi:10.1016/S1472–792(09)70007

8. Kuhn, TS. (1966). "The structure of scientific revolutions."

Chicago, IL: University of Chicago Press

9. Hunter R, Strickland F, Kezdy F. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants I. Therole of hydrophile–lipophile balance. *J Immunol*. 1981; 127:1244–50.

10. Newman MJ, Actor JK, Balusubramanian M, Jagannath C. Use of nonionic block copolymers in vaccines and therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1998; 15:89–142.

11. Retzinger GS, Meredith SC, Takayama K, Hunter RL, Kezdy FJ. The role of surface in the biological activities of trehalose 6,6' – dimycolate. Surface properties and development of a model system. *J Biol Chem*. 1981; 256:8208–16.

12. Behling CA, Bennett B, Takayama K, Hunter RL. Development of a

- trehalose 6,6' -dimycolate model which explains cord formation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1993;61:2296-303.
13. Schabbing RW, Garcia A, Hunter RL. Characterization of the trehalose 6,6' -di-mycolate surface monolayer by scanning tunneling microscopy. *Infect Immun*. 1994; 62:754-6.
14. Retzinger GS, Meredith SC, Hunter RL, Takayama K, Kezdy FJ. Identification of the physiologically active state of the mycobacterial glycolipid trehalose 6,6' -di-mycolate and the role of fibrinogen in the biologic activities of trehalose 6,6' -di-mycolate monolayers. *J Immunol*. 1982;129:735-44.
15. Wiessner JH, Henderson JJ, Sohnle PG, Mandel NS, Mandel GS. The effect of crystal structure on mouse lung inflammation and fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1988; 138:445-50.
16. Syed SS, Hunter RL. The toxicity of TDM for macrophages depends on its surface structure. *FASEB J*. 1995; 9:A509.
17. Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity

of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci.* 2004; 77:126-34

18. Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitory tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2006; 36:371-86.

19. Hunter RL, Olsen M, Jagannath C, Actor JK. Trehalose 6,6' - dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice. *Am J Pathol.* 2006; 168:1249-61.

20. Hunter RL, Jagannath C, Actor JK. Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs. *Tuberculosis (Edinb).* 2007; 87:267-78.

21. Jagannath C, Emanuele MR, Hunter RL. Activity of poloxamer CRL-1072 against drug-sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and in mice. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 15:55-63.

22. Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL Jr, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med.* 2009; 15:267–76.
23. Hunter RL, Venkataprasad N, Olsen MR. The role of trehalose dimycolate (cord factor) on morphology of virulent *M. tuberculosis* in vitro. *Tuberculosis.* 2006 Sep; 86(5):349–56.
24. Arora, A.; Armitige, LY.; Wanger, A.; Hunter, R. Production of trehalose dimycolate (TDM) by pulmonary and extrapulmonary isolates of *Mycobacterium*. *ASM Abstracts 108th General Meeting*; 2008. p. U–053/0933
25. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics[Review]. *FEMS Microbiol Lett.* 1994; 123:11–826.
26. Hart DP. *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages: Effect of certain surfactants and other membrane active compounds. *Science.*

1968; 162:686–9.

27. WHO Report 2006. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO/HTM/TB/2006362. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2006.

28. Pagel, W.; Simmonds, F.; MacDonald, N.; Nassau, E. Pulmonary tuberculosis, bacteriology, pathology, management, epidemiology and prevention. London: Oxford University Press; 1964. Chapter 3. The morbid anatomy and histology of tuberculosis, an introduction in simple terms; p.36–63.

29. Rich, A. The Pathogenesis of tuberculosis, second edition. Springfield, Illinois: Charles C Thomas;1951.

30. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, et al. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. Mol Microbiol. 2008; 69:164–74.

31. Bloch H, Noll H. Studies on the virulence of tubercle bacilli.

- Variations in the virulence effect elicited by Tween 80 and thiosemicarbazone. *Br J Exp Pathol.* 1953; 97:1–16.
32. Silva CL. Participation of tumor necrosis factor in the antitumor activity of mycobacterial trehalose dimycolate (cord factor). *Braz J Med Biol Res.* 1989; 22:341–4.
33. Indrigo J, Hunter RL Jr, Actor JK. Cord factor trehalose 6,6′ – dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology.* 2003; 149:2049–59.
34. Indrigo J, Hunter RL Jr, Actor JK. Influence of trehalose 6,6′ – dimycolate (TDM) during nmycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology.* 2002; 148:1991–8.
35. Kan–Sutton C, Jagannath C, Hunter RL Jr. Trehalose 6,6′ – dimycolate on the surface of *Mycobacterium tuberculosis* modulates surface marker expression for antigen presentation and costimulation in murine macrophages. *Microbes Infect.* 2009; 11:40–8.
36. Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the

- genes encoding antigen 85A and antigen 85B of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. Infect Immun. 2000; 68:767-78.
37. Copenhaver RH, Sepulveda E, Armitige LY, Actor JK, Wanger A, Norris SJ, et al. A mutant of Mycobacterium tuberculosis H37. Rv that lacks expression of antigen 85A is attenuated in mice but retains vaccinogenic potential. Infect Immun. 2004; 72:7084-95.
38. Hwang SA, Wilk K, Kruzel ML, Actor JK. A novel recombinant human lactoferrin augments the BCG vaccine and protects alveolar integrity upon infection with Mycobacterium tuberculosis in mice. Vaccine. 2009; 27:3026-34.
39. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell
40. 질병관리본부, "결핵환자 신고현황 연보 2010", 2011.
41. Hudelson P., "Gender differentials in tuberculosis: The role of

socio-economic and cultural factors," *Tuberculosis and Lung Disease* 1996, 77(5), pp.391-400.

42. Baker MA et al., "Systematic review: the impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes." *BMC Medicine* accepted 2011,9, p81.

43. 정태원 외(2014) "결핵균 균삭(Cord formation)형성과 1차 약제와의 연관성 비교". *대한임상병리사학회*, 제52회 전국임상병리사 종합학술대회 초록집, p51.

44. Godfrey-Faussett P, Sonnenger P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, Murray J. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. *Lancet*. 2000 Sep 23;356(9235):1066-71

45. GarcML, Ponce de LeA, JimA, Palacios-MartM, Balandrano-Campos S, Ferreyra-Reyes L, JuL, Sifuentes-Osornio J, Olivera-DH,

Valdespino-GJL, Samll PM. Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med.* 2000 Mar 13;160(9):630-6

46. KrA, Hoffner SE, Silastu H, Danilovis M, Levina K, Sveson SB, Ghebremichael S, Koivula T, KG, Spred of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia . *J Clin Microbiol.* 2001 Sep;39(9):3339-45

47. Teixeira L, Perkins MD, Johnson JL, Keller R, Palaci M, do Valle Dettoni V, Candedo Rocha LM, multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuber Lung Dis.* 2001 Apr;5(4):321-8

ABSTRACT

M. Tuberculosis Cord Formation and Primary Drug

Resistance Evaluation for Tuberculosis Treatment

Se-yeong Lee

Graduate School of Public health,

Seoul National University.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that is the second most frequent cause of death for adults, next to AIDS, around the globe; among the OECD member countries, South Korea is one of the

countries with the greatest incidence and mortality rates of the disease. With the recently increasing occurrence of TB, multidrug-resistant tuberculosis (MDR TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) have proved great menaces to eradication of TB. Since great weight is placed on the rate of drug-resistant TB in treating TB, it is crucial to determine if there is resistance of *M. tuberculosis* (MTB) promptly in treating TB. In case of relaxation caused by resistance in treating TB, however, it may take one to two months to perform susceptibility test of such anti-TB drugs as Isoniazid and Rifampin, delaying the time for treatment with the secondary drugs. For this reason, it is necessary to develop a testing method that can diagnose resistant TB relaxation promptly in addition to susceptibility test of anti-TB drugs. TB diagnosis and treatment may accompany anti-TB drug susceptibility test and acid fast stain and the acid fast stain of MTB in liquid culture may show its growth into a unique shape of cord. This is called MTB cord formation, which is caused by trehalose-6,6' -

dimycolate (TDM) on the surface of lipid of toxic MTB. Toxic TB with no history of taking any anti-TB drug showed cord formation but showed no cord formation if it was susceptible to anti-TB drugs. However, if toxic TB continues to show cord formation although it is found to be susceptible in anti-TB drug resistance test, it may be relaxed as resistant TB later. The purpose of this study was to hypothesize that MTB cord formation would have certain association with susceptibility to anti-TB drugs, prove the hypothesis, and develop a diagnostic method to make preliminary diagnosis of resistant TB relaxation.

This study aimed to compare susceptibility to such primary anti-TB drugs as Isoniazid and Rifampicin between the cord formation group and the non-formation group, determine the association, and develop a testing method to diagnose resistant TB relaxation promptly. It also aimed to establish human data concerning cord formation toxicity and contribute to TB control projects at the national level.

MTB isolated from a total of 583 samples of patients with MTB

detected in tertiary medical institutions from May 2012 to December 2013 went through liquid culture, followed by acid fast stain and anti-TB drug resistance test. Grouping was performed on the basis of cord formation status, as found by acid fast stain, and an attempt was made to determine if cord formation had certain association with drug resistance in the detected MTB on the basis of the results from the primary drug susceptibility test.

Of 583 samples from which MTB was detected, 192 (33.0%) showed cord formation. The rate of susceptibility test for Isoniazid (INH) and Rifampin (RIF) was 505 samples (86.6%) for susceptibility/susceptibility, 40 (6.9%) for resistance/susceptibility, 37 (6.3%) for resistance/resistance, and 1 (0.2%) for susceptibility/resistance; that of cord formation was 144 (75.0%) for susceptibility/susceptibility, 24 (12.5%) for resistance/susceptibility, and 24 (12.5%) for resistance/resistance; and that of INH and RIF susceptibility test in the samples with no cord formation was 361

(92.3%) for susceptibility/susceptibility, 16 (4.1%) for resistance/susceptibility, 13 (3.3%) for resistance/resistance, and 1 (0.3%) for susceptibility/resistance. INH resistance was statistically significantly higher in the samples with cord formation (25%; 48/192) than in those with no cord formation (7.42%; 29/391) ($p < 0.0001$) and RIF resistance was also statistically significantly higher in the former (24%; 48/192) than in the latter (3.58%; 14/391) ($p < 0.0001$).: Grouping was performed on the basis of cord formation status, as found by acid fast stain, and an attempt was made to determine if cord formation had certain association with drug resistance in the detected MTB on the basis of the results from the primary drug susceptibility test. The cord formation group was statistically significantly more resistant to primary anti-TB drugs—Isoniazid and Rifampicin—than the non-formation group. Acid fast stain, which can make it possible to determine cord formation status promptly, is expected to be useful as a testing method that can make preliminary diagnosis of resistant TB

relaxation while waiting for the results of long-term anti-TB drug susceptibility test.