

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)를 이용한 피부 노카르디아증의 진단

경북대학교 의학전문대학원 피부과학교실

이규채 · 김민지 · 은동혁 · 이해숙 · 장용현 · 이석종 · 김도원 · 이원주[†]

= Abstract =

Diagnosis of Cutaneous Nocardiosis with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Kyou Chae Lee, Min Ji Kim, Dong Hyuk Eun, Hae Sook Lee, Yong Hyun Jang, Seok-Jong Lee, Do Won Kim and Weon Ju Lee[†]

Department of Dermatology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Nocardiosis is a rare but potentially life-threatening infectious disease caused by several species of the genus *Nocardia* (*N.*), which are aerobic, filamentous, gram-positive bacilli. A definitive diagnosis depends on the isolation and identification of *Nocardia* species. But identification from clinical specimens may involve performing invasive techniques on the patient and lengthy process (take up to 1 or 3 weeks) owing to slow growth, and require a professional microbiologist. Currently the genus *Nocardia* is best identified using 16S rRNA and 18S rRNA gene sequence analysis. Recently matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has launched a new era in the routine microbiology laboratory. This method has proved its efficacy for the identification and diagnosis of microorganism. MALDI-TOF MS has potential for use as a rapid (within 1 hour) and dependable method for the identification of *Nocardia* species with reproducibility and cost effectiveness. We report a 76-year-old woman who suffered from ulcer with papules on her right wrist and forearm. A biopsy of the skin showed granulomatous inflammation with central suppuration. A bacterial isolate from the skin was identified to be *N. brasiliensis* on comparative 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF MS. To the best of our knowledge, this is the first case of nocardiosis in Korea caused by *N. brasiliensis* identified on MALDI-TOF MS. [Korean J Med Mycol 2016; 21(2): 39-46]

Key Words: MALDI-TOF MS, Nocardiosis

Received: April 5, 2016, Revised: May 2, 2016, Accepted: May 11, 2016

[†]Corresponding author: Weon Ju Lee, Department of Dermatology, Kyungpook National University School of Medicine, 130, Dongdeok-ro, Jung-gu, Daegu, 41944, Korea.

Tel: +82-10-7730-8877, Fax: +82-53-426-0770, e-mail: weonju@knu.ac.kr

Copyright©2016 by The Korean Society for Medical Mycology (pISSN:1226-4709, eISSN:2465-8278). All right reserved.

©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. <http://www.ksmm.org>

서 론

Nocardia (*N.*) 균종은 그람양성 호기성 방선균으로 식물과 토양에 주로 존재하며, 인체에는 드물게 감염되나, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* 등은 인체에 감염을 일으킬 수 있다¹. 이 중 임상적으로 가장 흔하게 동정되는 균주는 *N. asteroides*이며, 원발성 피부 감염에서는 *N. brasiliensis*가 가장 흔한 균주이다². *Nocardia*는 면역력이 저하된 환자에서 폐, 피부 그리고 중추신경계에 감염을 일으키는 것으로 보고되며, 파종성이 강하고 화농성 육아종성 질환의 양상으로 나타난다³.

노카르디아증의 진단은 과거 균주의 배양검사를 통해 이루어졌으나 시간이 많이 걸리며, 전문 인력이 필요하였다. 이후 분자생물학적 분석이 발달함에 따라 균주의 동정이 보다 정확하고 신속하게 이루어지게 되었으며, 16S 리보솜 RNA 염기서열 분석이 흔히 사용되고 있다². 최근에는 합성 고분자의 분자량 분석이나 Bio 관련 커다란 분자 (주로 단백질, 탄수화물)의 분자량 분석에 사용되는 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)를 이용한 신속하고, 정확한 균주의 동정이 다수 보고되고 있다⁴.

면역력이 저하된 환자들에게 주로 감염되는 노카르디아증은 초기 진단이 중요하다. 이에 저자들은 균배양 및 16S 리보솜 RNA 염기서열 분석뿐만 아니라 이전 국내에 보고된 바 없는 MALDI-TOF MS를 이용하여 노카르디아증을 진단하고 이의 유용성을 문헌 고찰과 함께 보고한다.

증 례

환 자: 배OO, 76세, 여자
 주 소: 오른팔의 통증을 동반한 경계가 불명확한 홍반성 궤양
 현병력: 환자는 내원 3주 전부터 오른 손목에



Fig. 1. (A) Localized ill-demarcated ulcerative erythematous patch studded with papulopustules and hand swelling (B) Close up view of the lesion

통증을 동반한 구진이 발생하여 점차 병변의 크기가 증가하며 부종 및 분비물을 동반하는 궤양으로 변화하였다.

과거력 및 가족력: 수년 전부터 고혈압과 류마티스 관절염으로 methylprednisolone, methotrexate을 포함한 약제를 장기복용 중이었으며, 외상 병력은 없었다.

피부 소견: 오른 손목 부위에 다양한 크기의 경계가 불명확한 홍반성 궤양과 병변 내부 및 주위에 다양한 크기의 홍반성 구진이 관찰되었다 (Fig. 1).

이학적 소견: 피부 소견 외 특기사항 없음

병리조직학적 소견: 표피는 불규칙적인 가시세포층을 보였고, 진피에 다수의 호중구와 림프구를 동반한 화농성 염증 소견이 보였다 (Fig. 2A, 2B). D-periodic acid schiff (PAS)와 Gomori-methenamine silver (GMS) 염색에서는 음성 소견을 보였다 (Fig. 2C, 2D).

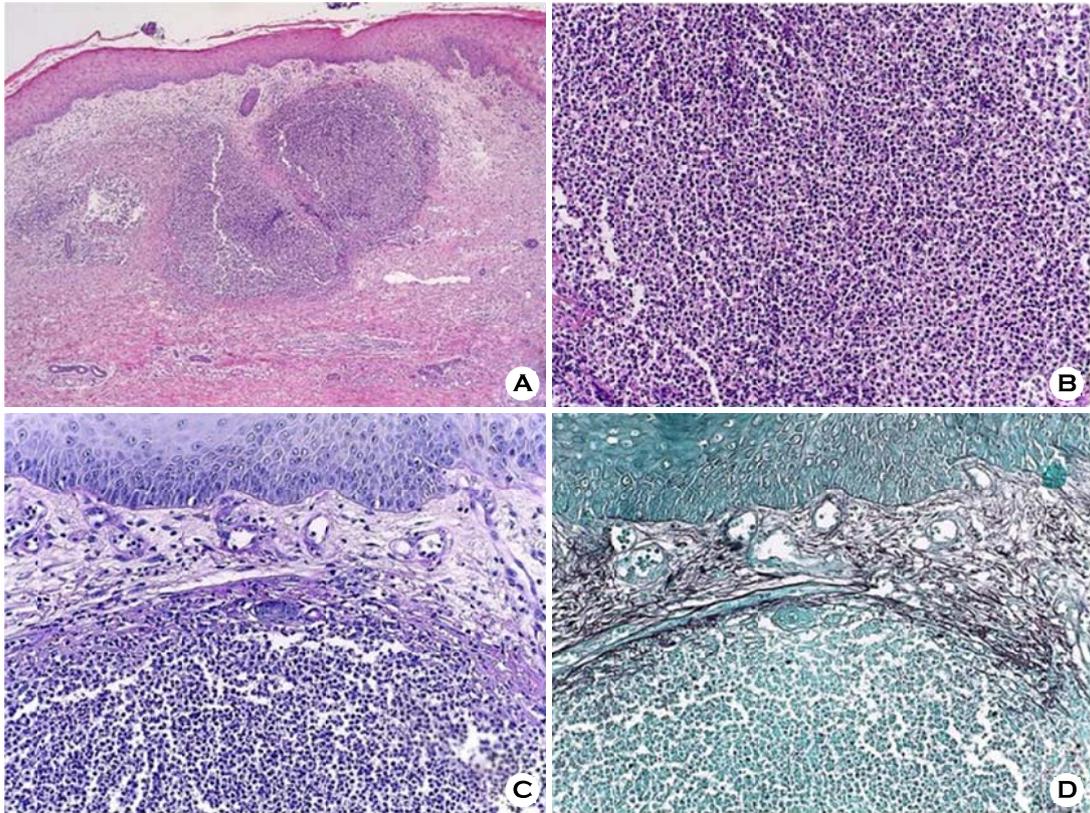


Fig. 2. (A) Acanthosis in epidermis and nodular inflammatory infiltration in dermis (H&E stain, $\times 40$) (B) Suppurative inflammation composed of neutrophils and lymphocytes in dermis (H&E stain, $\times 200$) (C), (D) Not detectable for fungal infection (D-PAS stain $\times 200$, GMS stain $\times 200$)

진균학적 소견: 생검 조직을 혈액 한천배지와 3% Ogawa 배지에 접종하여 37°C에서 배양한 결과 하얗고 건조한 양상의 균집락을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3A, 3B). 배양된 집락의 도말염색 결과가 가늘게 분지된 그람양성 간균이 관찰되었으며, 항산성 염색에서는 약양성 소견이 관찰되었다 (Fig. 3C, 3D).

분자생물학적 검사: 잘 형성된 집락으로부터 유전자를 추출하여 중합효소 연쇄반응 {Polymerase Chain Reaction (PCR)}을 이용한 16S 리보솜 RNA 염기서열 분석을 시행하였고, 분석된 결과를 Basic Local Alignment Search Tool을 이용하여 NCBI GenBank의 염기서열과 대조한 결과 *N. brasiliensis*

(GenBank accession number NR_074743.1) ATCC 700358 strain HUJEG-1과 99% 일치하는 소견을 얻었다.

MALDI-TOF MS: Microflex LT (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany)와 MALDI-TOF BioTyper (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany)를 이용하여 동정하였다 (Fig. 4). 대략적인 방법은 다음과 같다. 배지에서 자란 집락을 metal plat에 직접 도말하여 건조시키고, 회사에서 제공한 매트릭스 용액을 첨가하여 다시 건조시킨 후 Microflex LT 장비에 장착하였다. 장비의 검출기에 의한 결과는 MALDI-TOF BioTyper program (version 2.0)에 의하여 표준과 비교하여 동정되었다. 동정치 (score value)의

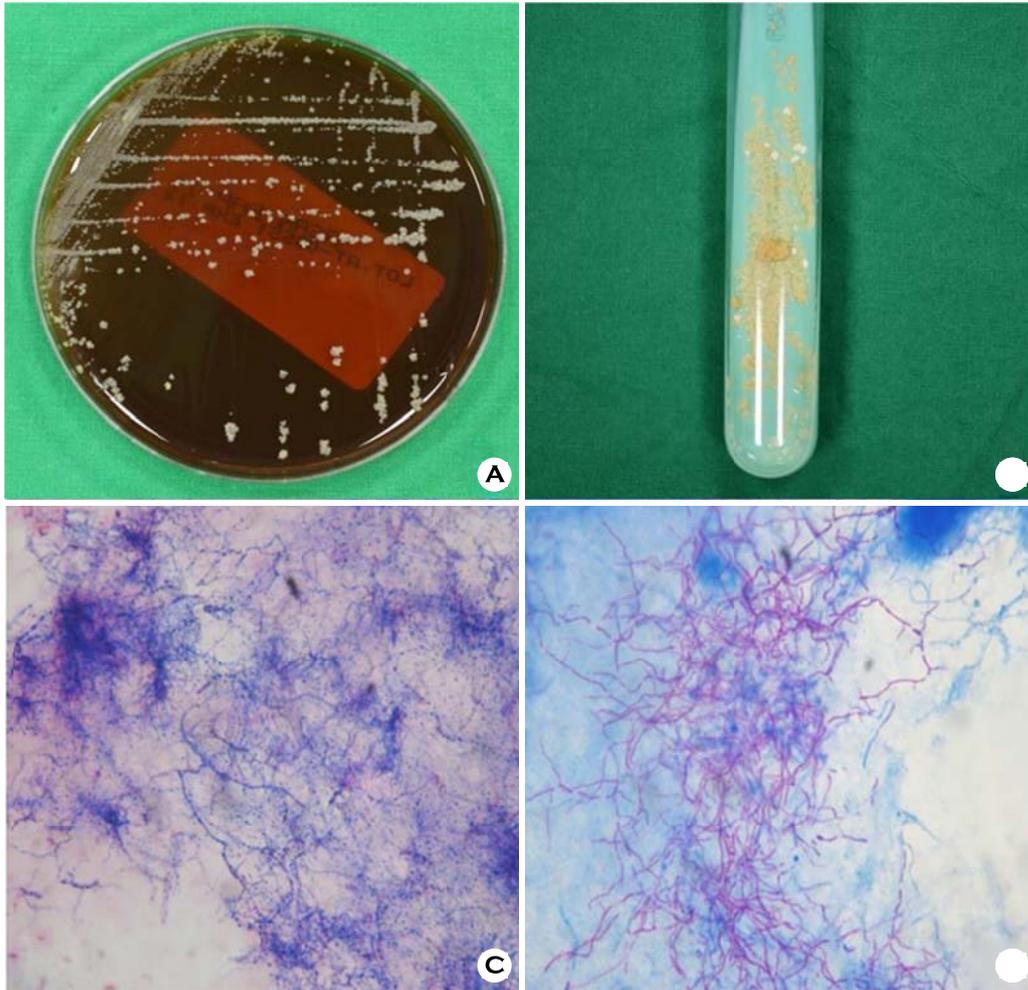


Fig. 3. (A) Chalky, matt, crumbly grayish-white colonies at 37°C (B) Whitish, wrinkled, heaped up, dry colonies (A: blood agar, B: 3% Ogawa medium) (C) Gram-positive (D) Weakly positive in a modified Ziehl-Neelsen stain

결과 해석은 기기회사의 기준에 따라 2.0 이상이면 균종동정이, 1.7~2.0인 경우 균속동정이 가능한 것으로, 1.7 이하이면 신뢰성이 떨어지는 것으로 판정하였다. 동정결과 배양 및 분자생물학적 검사결과와 일치하게 *N. brasiliensis*로 확인되었다 (Fig. 5).

치료 및 경과: 초기에 ampibactam 3 g을 1일 3회 경구투여와 mupirocin 연고 도포로 치료하였으나 병변의 호전 보이지 않았고, 이후 trimethoprim-

sulfamethoxazole (TMP/SMX) 80/400 mg을 1일 2회 경구투여로 4주간 치료 후 피부 병변은 호전되었다.

고 찰

*Nocardia*는 1888년 Edmond Nocard가 소에서 최초로 발견, 분리하였으며, 1890년 Eppinger에 의해 인체에 감염된 임상 증례가 처음 보고된 호산

성, 비운동성의 그람양성 균주로 어디에나 존재하고 특히 토양에 널리 분포하고 있다⁵. 처음에는 진균학 분야로 구분되었으나, 현재는 진균양 세균 (fungus-like bacteria)으로 분류되며, 이는 기질의 직경이 1 µm 이하, PAS 염색에 음성, sulfonamide 등의 항진균성 작용이 없는 항생제에 대한 감수성,

세포막에 sterol이 없는 특성 등을 가지고 있기 때문이다⁶.

*Nocardia*는 공기 중의 균의 흡입에 의한 경우와, 드물지만 외상 후 직접 피부를 통해 주입되는 경우가 있다. 균의 흡입에 의한 폐 감염이 가장 흔한 형태이며, 이 중 대부분은 *N. asteroides*에 의해 발생한다⁷. 원발성 피부 감염증은 피부의 상처를 통한 *Nocardia*의 주입에 의해 발생하는 드문 질환으로, 이 경우 *N. brasiliensis*와 *N. transvalensis* 등이 주된 원인이다¹. 노카르디아는 흔하지 않지만 생명을 위협할 수 있는 감염성 질환으로 최근 노카르디아증에 대한 보고가 증가하고 있다. 전형적으로 림프구성암, 쿠싱증후군, 후천성면역결핍증후군, 장기이식 수혜자, 고용량 스테로이드 복용 환자 등과 같이 면역억제 상태에서 발생하며 세포성 면역억제가 노카르디아 감염 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다⁸. 본 증례의 경우 다른 피부노카르디아증의 국내보고에서와 유사하게 고령의 환자이며 기저 질환이 있었다. 현재는 16S rNRA 유전자 염기서열 등과 같은 새로운 분자기법 등을 통해 50여종의 *Nocardia*가 확인되었고, 이 중 *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. pseudo-brasiliensis* 등과 같은 16여 종의 인체 감염이 보고된 바 있다^{9,10}.

노카르디아증은 sulfonamide가 치료 약물로 사



Fig. 4. Microflex LT (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany)

Result Overview

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
2 (++) (A)	<i>Nocardia</i> sp	2.035	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1.994
1 (+) (B)	<i>Nocardia</i> sp	1.882	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1.775

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300...3.000	Highly probable species identification	(+++)	Green
2.000...2.299	Secure genus identification, probable species identification	(++)	Green
1.700...1.999	Probable genus identification	(+)	Yellow
0.000...1.699	Not reliable identification	(-)	Red

Fig. 5. Score value of isolates (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) in MALDI-TOF MS

용되어 왔으며, 특히 trimethoprim과 sulfamethoxazole의 병합요법이 좋은 효과를 보인다. 그런데, 균 동정이 빠르고 정확하게 이루어지면 치료를 보다 효과적으로 시행할 수 있으므로 균을 동정하는 많은 방법들이 발전하고 있다. 노카르디아증의 진단에는 배양검사, 도말염색 및 변형 항산성 염색이 이용되며, brain heart infusion 한천배지나, Sabouraud dextrose 우무배지, 혈액우무배지 등 일반배지에서 잘 배양된다². 배양 소견은 하얗고 주름진 건조한 양상의 집락을 보이며, 서서히 자라서 균종의 종류에 따라 3일에서 2주 이상의 배양기간이 필요하다. 도말염색에서는 그람양성 막대균으로 관찰되며, 산의 농도를 낮춘 변형 항산성 염색에서는 양성을 보인다. 균주를 동정하기 위한 방법으로 기존에는 urea hydrolysis, pyrrolidonyl aminopeptidase, gamma-glutamyl aminopeptidase, alpha-mannosidase, alpha glucosidase 등의 생화학적 방법을 사용했지만 시간이 많이 걸린다는 단점이 있다³. 이러한 단점을 보완하기 위해 Wauters 등¹¹은 임상적으로 흔히 관찰되는 6종의 *Nocardia*를 효소적 방법 (enzymatic test)을 이용하여 신속하게 진단하는 방법을 소개한 바 있었으며, Conville 등¹²이 중합효소 연쇄반응을 이용한 16S rRNA 염기서열 분석을 시행한 이후 현재까지 신속하고 정확한 방법으로 이용되고 있다.

MALDI-TOF는 검체를 이온화하여 진공관에서 검출기에 도달하는 시간을 근거로 구성 물질의 질량을 측정하는 방법이다. 최근 개발된 MALDI Biotyper는 MALDI-TOF MS 기법을 이용하여 얻은 세균의 단백질 성분을 분석하여 균을 동정하는 프로테오믹 기법 (proteomic method)으로, 이미 구축된 각 균종의 정보와 비교 분석하여 다양한 미생물 (microorganisms)을 감별, 동정하는 미생물학에서의 새로운 분야이다¹³. MALDI-TOF MS는 분석체 (analyte)의 조각으로부터 원래 분석체의 질량을 예측하는 기존의 질량 분광학과는 달리, 시료에 자외선을 흡수하는 매트릭스 (결정화가 가능한 저분자 유기화합물)를 첨가하여 결정화시킨 후, 레이저를 조사하여 이온화시켜 생성된 이온

들의 비행시간의 차이로 질량을 분석하는 분석 방법이다¹⁴. 이런 방식으로 최근 그람양성 세균, 그람음성 세균, 장내세균, 효모균 등 다양한 microorganism을 분석하는 보고가 나오고 있으며, 기존의 방법으로는 동정하기 까다로운 *Nocardia* 같은 organism의 동정시간을 줄이며, 정확하고, 쉬우며, 상대적으로 경제적인 MALDI-TOF MS로 동정하는 보고가 나오고 있다^{4,15}. 이전의 보고에 의하면 MALDI-TOF MS 동정시간은 배양균주당 평균 6분이며, 산출된 동정 비용은 상품화 키트를 포함한 전통적 동정 방법의 22~32%로 임상 미생물 검사실에서 이용하기에 간편하고 동정에 소요되는 시간이 매우 짧으며 소모 비용이 적다고 보고하고 있다¹⁶⁻¹⁸. 또한, MALDI-TOF MS를 이용한 산소성 세균의 동정은 생화학적 성상을 기반으로 하는 전통적 방법, 상품화 kit와 높은 일치율을 보였다는 보고가 있다¹³. 하지만 동정치의 신뢰도가 낮은 경우는 직접도말법 재검에 단백추출법을 추가하여 대부분 균종동정 결과를 얻을 수 있다고 보고되고 있으나 직접도말법 재검 및 단백추출법 추가로도 동정치의 신뢰도가 낮은 소수의 균주들은 전통적인 동정법과 분자유전학적 방법을 추가할 필요가 있을 것이며, 구축된 세균의 단백질 정보의 부족으로 인한 제한 등이 발생할 수 있을 것으로 생각된다.

본 증례에서는 검체를 혈액우무배지와 3% Ogawa 배지에 배양한 결과 하얗고 건조한 균집락을 관찰할 수 있었고, 배양된 집락의 도말염색 결과 가늘게 분지된 그람양성 막대균이, 항산성 염색에서는 약양성 소견이 관찰되어 노카르디아증으로 진단되었다. 또한 분자생물학적 검사에서도 *N. brasiliensis*로 진단되었다. MALDI-TOF MS를 통해서도 *N. brasiliensis*를 확인할 수 있어 이 방법이 노카르디아증의 진단 및 균종 확인에 유용한 방법이 될 수 있음을 확인하였다. 이에 저자들은 노카르디아증이 의심되는 경우에 빠른 진단을 위해 MALDI-TOF MS를 이용할 수 있음을 알리고자 이 증례를 문헌 고찰과 함께 보고한다.

Conflict of interest

None declared.

REFERENCES

1. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol* 2003;41:4497-4501
2. Shin JU, Kwon YS, Kim HJ, Park Y, Lee K, Lee KH. A case of disseminated cutaneous nocardiosis due to *Nocardia brasiliensis* diagnosed by fine needle aspiration biopsy and 16S ribosomal RNA sequencing. *Korean J Dermatol* 2009;47:1024-1028
3. Kang GS, Kim DM, Lee MH, Suh MK, Ha GY, Jang TJ, et al. Primary cutaneous nocardiosis caused by *Nocardia brasiliensis*. *Korean J Dermatol* 2011;49:730-734
4. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nocardia species. *J Clin Microbiol* 2010;48:4015-4021
5. Chang WI, Kim SJ, Kim YC, Kwon KT, Oh WS, Peck KR, et al. A case of primary cutaneous nocardiosis in a patient with lung cancer. *Korean J Med* 2007;73:342-345
6. Kim JH, Yoon KH, Yoo JH, Kang HM, Suh JT. A case of nocardiosis. *Tuberc Respir Dis* 1992;39:355-360
7. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:213-264
8. Jung HS, Lee SH, Kim HY, Chu EH, Lee KW, Kang MJ, et al. A case of *Pneumocystis carinii* pneumonia and cutaneous nocardiosis associated with ectopic ACTH syndrome. *J Kor Endocr Soc* 2008;23:44-50
9. Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. *J Clin Microbiol* 2002;40:1346-1351
10. Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J Clin Microbiol* 2003;41:851-856
11. Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vanechoutte M, Delmee M. Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;43:2624-2628
12. Conville PS, Fischer SH, Cartwright CP, Witebsky FG. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2000;38:158-164
13. Kim M, Kwon MJ, Chung HS, Lee Y, Yong D, Jeong SH, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of aerobic bacteria in a clinical microbiology laboratory. *Korean J Clin Microbiol* 2012;15:60-66
14. Desorption Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36:380-407
15. Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and other aerobic actinomycetes. *J Clin Microbiol* 2016;54:376-384
16. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010;48:1549-1554
17. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49:543-551

18. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010;48:3482-3486
-