결핵의 새로운 진단법

New Diagnostic Methods for Mycobacterium Tuberculosis Infection

신 동 호
한양의대 내과
Dong Ho Shin, MD
Department of Internal Medicine, Hanyang University College of Medicine
E-mail : shindh@hanyang.ac.kr

J Korean Med Assoc 2006; 49(10): 773 - 80

Abstract

Rapid and accurate diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in symptomatic patients is important for the global tuberculosis control strategies. Despite the enormous global burden of TB and the overall low rates of case detection worldwide, conventional diagnostic approaches have relied on tests that have several major limitations until recently, and standard treatment regimens have not changed for more than 30 yr. Recently remarkable progress in the basic science of immunology and molecular biology is ongoing to upgrade the speed and quality of diagnostic service and probably the strategy of the treatment of tuberculosis. In this review, we focus on strengths and limitations of newer tests that are available for the diagnosis of latent and active tuberculosis and the rapid detection of drug resistance, specifically, tests to measure of IFN-γ released from T-cell by stimulation with *M. tuberculosis* specific antigens, tests to amplify the nucleic acid for identification of *M. tuberculosis* complex, and rapid tests to detect drug resistance.

Keywords : Diagnosis; Mycobacterium tuberculosis; Drug resistance
핵 심 용 어 : 진단; 결핵균; 약제내성

전염성이 높은 결핵은 개인의 치료와 국가관리를 위해서 신속 정확하게 진단해야 한다. 현재는 객담 등의 환자 샘플에서 항산균 도말검사, 결핵균 배양과 약제감수성검사를 시행하여 결핵을 확진하지만 확진시간이 너무 길다. 또 최근 균에 노출되거나 균의 재활동 가능성이 높은 잠복감염을 진단하는 것도 중요하다. 결핵 진단을 위해 사용되는 현재의 검사들은 여러가지 결점들이 있다. 흉부방사선은 비특이적이며, 객담항산균도말검사는 민감도가 낮고, 배양검사와 약제내성검사는 복잡하고 결과가 늦다. 결핵피부반응검사(tuberculosis skin test, TST)는 부정확하며 비특이적이다. 그러므로 결핵 진단을 위해 더 쉬우면서 정확한 검사의 개발이 필요하다.

최근 면역학과 분자생물학의 급격한 발전으로 잠복결핵의 진단, 결핵

Table 1. Comparison of Tuberculin Skin Test (TST) and RD1−based IFN−γ assays (4)

Performance and Operational Characteristics	TST	RD1 based IFN−γ assays
Estimated sensitivity (in patients with active TB)	75~90 %	80~95 %
Estimated specificity (in healthy individuals with no known TB disease/exposure)	70~95 %	95~100 %
Cross−reactivity with BCG	yes	less likely
Cross−reactivity with nontuberculous mycobacteria	yes	less likely
Benefits of treating test−positives (based on randomized controlled trials)	yes	no evidence
Boosting phenomenon	yes	no
Material costs	low	high
Time to obtain a result	2~3 d	1~2 d, but longer if run as batches
Laboratory infrastructure required	no	yes

균 확인방법, 그리고 약제내성결핵의 진단에서 새로운 방법들이 개발되어 왔다. 본 특집에서는 새롭게 개발된 진단법들에 대하여 알아보도록 한다.

잠복결핵(Latent TB Infection)의 진단

결핵피부반응검사(TST)는 최근까지 잠복결핵 진단에 유일한 방법이지만 많은 임상적 단점들이 있다(1). TST 양성 여부는 접종부위의 결절 크기로 결정되나 결핵 환자라도 면역상태에 따라 그 결과가 달라지므로 판정시 이를 고려하여야 하며, 뚜렷한 면역저하가 없는 경우에도 10~20%에서 TST가 음성일 수 있으며, BCG 예방접종이나 비결핵성 마이코박테리움(nontuberculous mycobacterium, NTM)에서도 양성일 수 있으므로 이 경우 결핵균과 이들 세균의 감염 여부를 감별해야 한다.

1. RD1 based IFN−γ Assays

결핵균 항원으로 환자의 T 림프구를 자극하여 생성되는 IFN−γ 양의 측정법들이 개발되어 왔다. 개발 초기는 자극항원으로 PPD(purified protein derivatives)를 사용하였지만, 최근에는 결핵균 특이 단백질인 ESTA−6(early secreted antigen target−6)와 CFP−10(culture filtrate protein−10)를 자극항원 사용한다. 이 단백질들은 결핵균 유전체의 RD1 구역 내 유전자에서 생성되는데, 이 부위는 BCG나 *M. avium*에 없는 결핵균 특이유전자로 알려져 있다(2, 3).

RD1 based IFN−γ assay로는 QuantiFERON−TB Gold assay(Cellestis Ltd., Carnegie, Australia)와 T SPOT−TB test(Oxford Immunotec, Oxford, UK)가 상품화되어 있다. QuantiFERON−TB Gold assay는 환자의 whole−blood를 사용하는 ELISA측정법으로, FDA 공인 하에 미국에서 사용하고 있다. T SPOT−TB test는 말초혈액의 단핵세포를 사용하는 ELISPOT 측정법으로 유럽에서 현재 사용되며 FDA 공인을 대기중이다.

IFN−γ assay들은 TST보다 결핵균 노출에 대한 특이도가 더 높고, 과거 BCG 접종의 영향을 덜 받으므로 거

Table 2. Percentage sensitivity and specificity of nucleic-acid amplification tests in different clinical samples (10)

	Smear-positive pulmonary		Smear-negative pulmonary		Extrapulmonary	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
Amplicor	97	> 95	40~73	> 95	27~98	> 95
AMTD	92~100	> 95	40~93	> 95	93	> 95
BD Probe Tec	90~100	92	33~100	83~97	76	> 90
Real time PCR	78	100	78	100	80	100

Amplicor, Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test (Roche Diagnostic Systems Inc, New Jersey, USA); AMTD, Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (Gen-Probe, California, USA); BD Probe Tec, BD Probe Tec ET Direct TB System (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA); PCR, polymerase chain reaction.

짓양성빈도를 감소시켜 잠복결핵의 선별과 치료관리에 더 효과적이다. 이 밖에도 의료서비스 종사자와 같이 TST를 반복적으로 해야 하는 경우 RD1-based IFN-γ assays가 더 편리하다(Table 1)(4).

결핵 유병률이 높아 출생시 BCG 예방접종을 시행했던 지역에서는 잠복결핵의 진단기준이 있지만 IFN-γ assays는 BCG 접종 상태나 나이와 성별의 영향이 적다고 한다. 하지만 국내 연구에 따르면, 잠복결핵의 추정유병률 33%(2004년도)에 비해 감염위험도가 낮은 군과 균에 우발적으로 노출된 군에서의 QuantiFERON-TB Gold 양성률이 각각 4%와 10%로 너무 낮아, 잠복결핵을 저평가할 가능성이 있다(5).

IFN-γ assays를 지지하는 연구들이 현재 증가추세이나, 검사 결과를 임상에 바로 적용하기에는 더 많은 연구가 필요하다. 면역결핍환자(HIV/AIDS), 폐외결핵환자, 소아, 그리고 결핵감염률이 높은 지역의 주민에서 이 검사의 역할과 유용성이 낮다고 하며(2, 4), 특히 장기간 반복 검사를 요망되는 의료서비스 종사자에서 결과의 재연성 연구가 아직 부족하며, 그 결과를 잠복결핵 진단과 활동성 결핵 치료에 이용할 수 있는지 아직 불분명하다(2, 4). 또 NTM 감염의 영향에 대한 연구가 더 필요하며, IFN-γ 양성과 활동성 결핵으로의 진행 관계도 거의 알려진 바가 없다.

결핵균 진단

1. Nucleic Acid Amplification(NAA)

환자의 객담 등에서 직접 NAA를 시행하여 결핵균 특이유전자를 확인하는 NAA kit로는 the Amplicor MTB test(Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ), the Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test(MTD) (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA)와 the BD ProbeTec Direct TB System(Becton Dickinson, Sparks,Maryland, USA) 등이 상품화되어 있다.

Amplicor MTB tests는 색 측정이 가능한 특이시동체(primer)로 결핵균의 16S rRNA 유전자를 증폭하는 검사다. MTD는 16S rRNA 유전자를 증폭하여 DNA probe로 확인하는 방법이다. BD ProbeTec Direct TB System는 IS6110과 16SrRNA 유전자에 있는 target sequence를 효소 복제하는 strand-displacement amplification을 기본으로한 반자동 검사다(6). 이 검사들은 폐결핵과 폐외결핵에서 특이도가 매우 높지만 민감

도는 낮다. 민감도는 특히 도말음성폐결핵이나 폐외결핵과 같이 검체 내 균수가 적을수록 더 낮아지며, 도말양성 폐결핵에서는 아주 높게 보고되어 왔다. 하지만 NAA가 현미경과 균배양검사를 아직은 대치할 수 없으므로 검사 판독시 검사결과와 임상소견을 함께 고려하여야 한다. NAA는 특이도와 양성예측률이 높으므로 도말항산균 양성시 핵산증폭검사 양성은 *M. tuberculosis*로 확진하는데 도움이 된다(7). 한편 민감도와 음성예측률이 낮으므로 NAA가 음성이라도 결핵을 완전히 배제할 수 없다. 그러므로 객담항산균도말이 음성이며 임상적으로 결핵 가능성이 낮으면 NAA는 추천되지 않는다. 또 NAA는 사멸균과 생존균 모두에서 양성이므로 치료중인 환자의 추적검사로 추천되지 않는다.

2. Real-time Polymerase Chain Reaction Techniques

최근 *M. tuberculosis*의 확진에 real-time PCR을 사용한다(8). Real-time PCR은 증폭핵산과 형광체부착 probe를 부합시키고 thermal cyclers 내에서 형광신호를 측정하는 방법이다. 일반적으로 민감도 71~98%, 특이도 100% 정도로 보고되지만(Table 2)(9, 10), 민감도는 균농도가 균일한 배양액과 달리 균농도가 일정하지 않은 임상검체에서는 초기 검체내 균의 DNA 양에 따라 영향을 받을 수 있다. Real-time PCR은 검체에서 DNA 추출 후 1.5~2시간 후면 결과판정이 가능하고, 1 tube에서 반응과 결과판독을 하므로 오염 가능성을 줄일 수 있다.

결핵균의 약제내성

결핵균 약제내성결과가 빠를수록 적절한 항결핵제를 신속히 투여할 수 있다. 결핵퇴치사업에서 MDR TB는 가장 큰 장애물이므로 이를 빨리 진단할 수 있는 방법들이 필요하다. 유전자형 방식은 검사시간이 짧고, 균배양이 필요 없고, 임상검체에서 직접 검사가 가능하며, 생물학적 위험이 적고, 자동화가 가능하지만, 검사방법이 복잡하다. 표현형 방식은 이보다 더 간단하여 임상세균실험실에서도 가능하다.

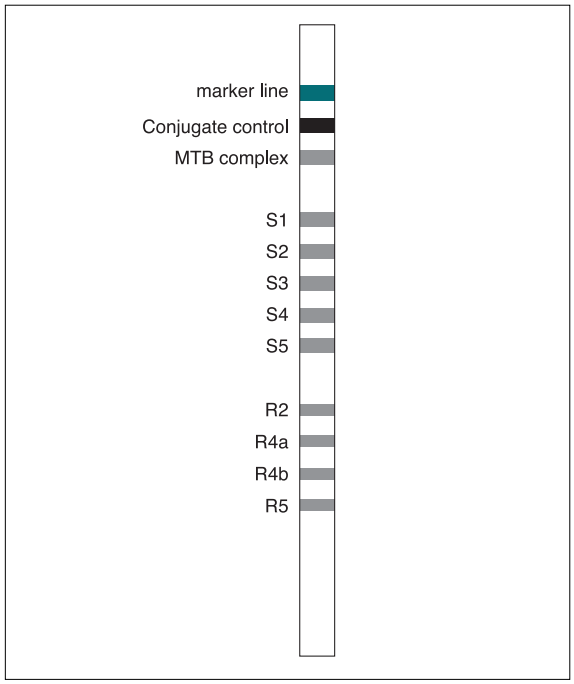

Figure 1. Strip layout of line probe assay for mycobacterium (INNO-LiPA Rif-TB. by Innogenetics)

1. DNA Sequencing

PCR로 증폭한 DNA의 염기서열분석법은 가장 정확하고 신빙도가 높아 돌연변이 확인에 절대 표준이 된다. Rifampicin 내성결핵균에서 rpoB유전자 내 돌연변이의 확인과 다른 항결핵제 내성관련 유전자들에서 돌연변이를 발견하기 위한 방법으로 많이 사용되어 왔지만, 방법이 복잡하고 비싸서 실제 임상에서 자주 이용하지 못한다(11).

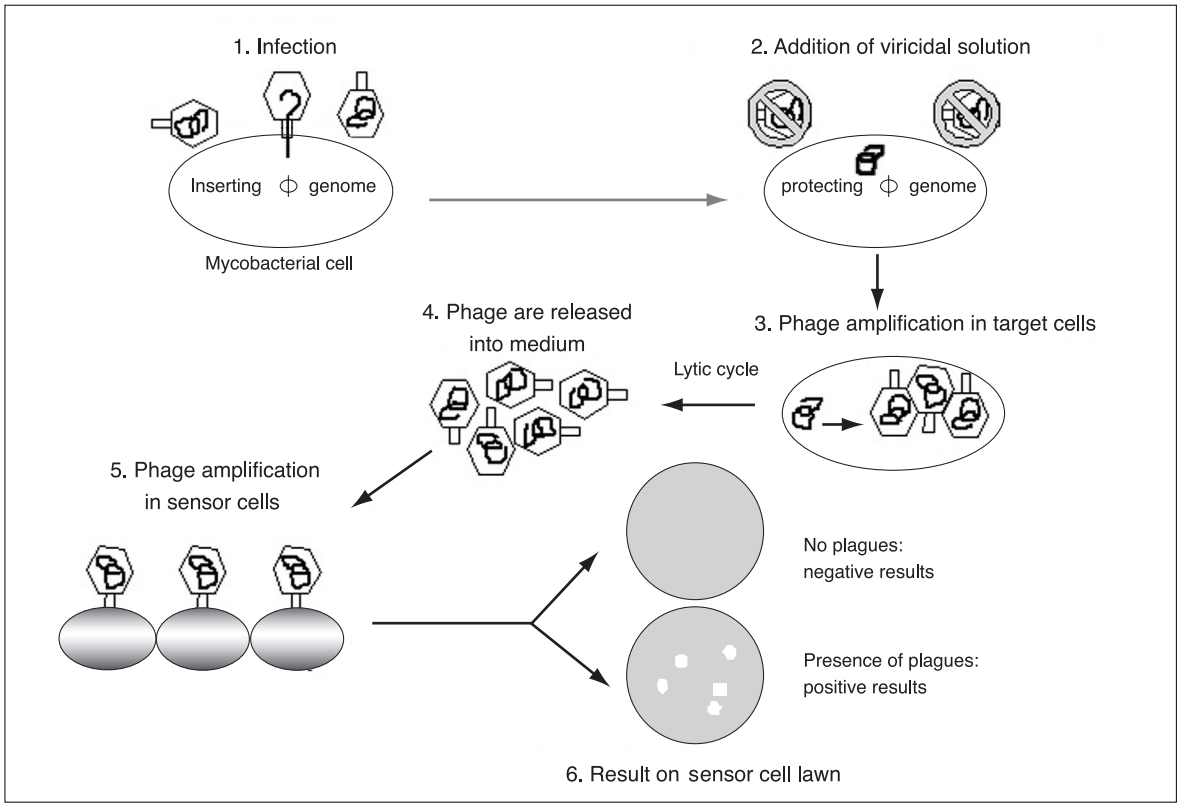

Figure 2. Overview of phage amplification assays (11)

2. Solid-phase Hybridization Techniques

Rifampicin 내성을 확인할 수 있는 Line Probe Assay (INNO-LiPA Rif TB Assay; Innogenetics, Ghent, Belgium)와 isoniazid와 rifampicin 내성을 동시에 확인할 수 있는 GenoType MTBDR assay(Hain Lifesciences, Nehren, Germany)가 상품화 되어 있다.

LiPA kit는 니트로셀룰로즈 종이 절편에 10개의 oligonucleotide probes(1개: *M. tuberculosis* complex probe, 5개: wild-type S probes, 4개 R probes for detecting specific mutations of resistant genotypes)를 고정시켰다(Figure 1). 배양액에서는 RIF 내성 진단율이 민감도(>95%)와 특이도(≫100%) 모두에서 매우 높지만, 환자 가검물에서는 민감도와 특이도가 이보다 낮아진다(12).

GenoType MTBDR은 katG와 *rpoB* 유전자의 가장 흔한 돌연변이를 검색하는데, 균배양액에서 isoniazid와 rifampicin 내성을 확인할 수 있었다. *rpoB* 유전자 돌연변이가 있는 다제내성결핵균의 99%와 katG 유전자의 codon 315에 돌연변이가 있는 균의 88.4%가 이 검사로 확인되었고, DNA 염기분석결과와도 100% 일치하여 민감도와 특이도가 아주 높다(13).

3. Microarrays

바이오칩으로 잘 알려져 있는 microarrays는 결핵균

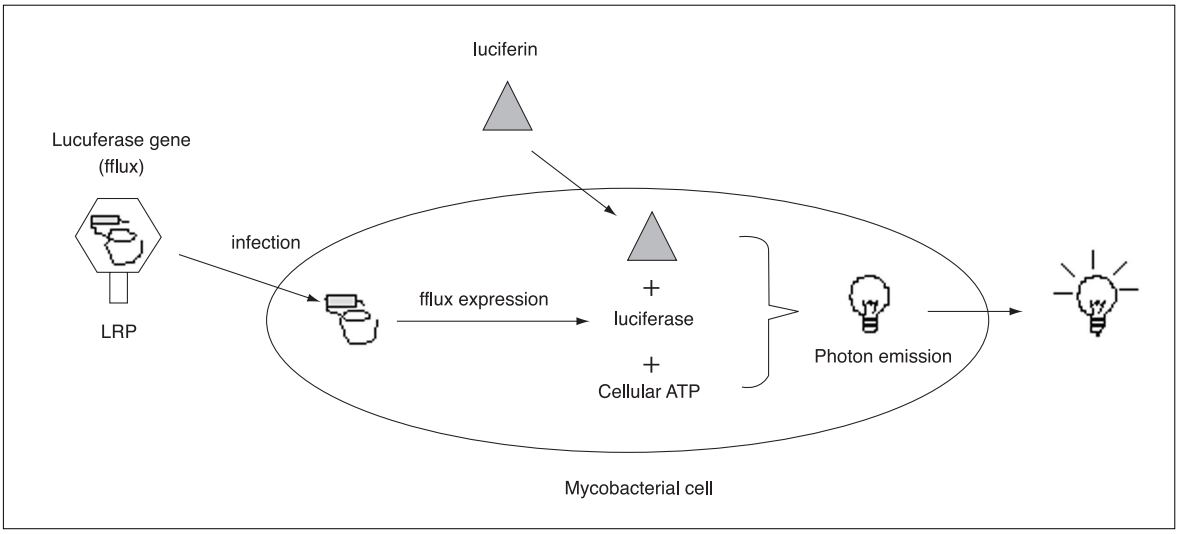

Figure 3. Overview of luciferase reporter phage (LRP) assays (11)

약제내성을 진단하는 새로운 분자생물학적 방법으로 대두되고 있다. 임상검체에서 얻은 DNA을 작은 glass slides에 미리 고정시킨 oligonucleotides와 부합시키는 것이 기본개념이다. 약제내성균 동정액과 임상 검체에서 12시간 이내에 결핵균 DNA를 추출하면 rifampicin 내성은 95% 이상에서, isoniazid 내성은 80% 이상에서 검출이 가능하다(14). 하지만 임상에서 이용하기에 검사비용이 고가이므로 당분간 보편화하기는 힘든 실정이다.

4. Real-Time Polymerase Chain Reaction Techniques

TaqMan probe, molecular beacons, 혹은 bioprobes 등을 이용한 real-time PCR 기법으로 약제내성 진단법이 개발되고 있다. 검사속도가 빠르며 오염 가능성이 적다는 점이 real-time PCR techniques의 장점이지만, 장비와 시약이 비싸며 숙련된 연구원이 필요한 것이 단점이다. 최근 임상검체에서 직접 검사하는 방법들이 개발되고 있다(15).

5. Phage-based Assays

배양액이나 임상검체 내에 살아있는 결핵균에 mycobacteriophages를 감염시키고 phage 증폭방법(Figure 2)이나 luciferase reporter 방법(Figure 3)으로 검체 내 결핵균 존재나 약제내성 여부를 알기 위한 검사다(11). FASTPlaque-TB assay(Biotec Laboratories Ltd., Ipswich, UK)는 임상검체에서 결핵균 검색을 위해, 그리고 FASTPlaque-TB-MDRi assay는 균배양 후 rifampicin 내성 여부를 알기 위해 phage 증폭방법으로 개발되어 상품화된 kit들이다. 최근에 추가로 개발된 FASTPlaque-TB-Response assay는 객담에서 직접 약제내성을 진단할 수 있다고 한다. 이들 phage 증폭방식의 Phage-based assay들로 rifampicin 내성균의 진단정확도는, 배양액에서 민감도와 특이도가 95% 이상이지만 객담에서는 특이도(<90%)가 낮아 아직은 배양액에서만 사용하도록 권장된다(16).

최근 개발된 Luciferase reporter 방법의 phage

based assay들은 1차 항결핵제들(4제)에 대한 내성균 진단을 위한 연구에서 BACTEC TB-460(Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) system과 비교하여 98.6%가 일치하였다. 또 isoniazid와 rifampicin 내성균의 진단시 100%의 민감도를 나타내는데, 향후 임상에서 MDR TB 진단에 유용하게 사용될 수 있다(17).

결 론

최근 결핵균을 빨리 진단하고 약제내성결핵균 여부를 신속하게 판단할 수 있는 새로운 방법들이 개발되고 있으며, 일부는 이미 상품화 되어 있다. 하지만 이 새로운 검사법들의 연구 결과들은 주로 결핵균 배양액을 검체로 하여 얻은 성적들이다. 실제 임상에서 사용되기 위해서는 직접 환자의 가검물로 한 임상시험의 결과가 중요하나 아직 이를 대상으로 한 잘 관리된 임상시험(well controlled clinical test)이 미약한 실정이다. 또한 사회 경제적으로도 기존의 진단방법에 비해 고가의 장비가 필요하고, 복잡한 검사방법과 비싼 검사비용 등은 임상에서 진단방법으로 보편화되기는 어렵다.

참 고 문 헌

1. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice: latent tuberculosis infection. N Engl J Med 2002; 347: 1860 - 6
2. Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis 2004; 4: 761 - 76
3. Dheda K, Udwadia ZF, Huggett JF, Johnson MA, Rook GA. Utility of the antigen-specific interferon-gamma assay for the management of tuberculosis. Curr Opin Pulm Med 2005; 11: 195 - 202
4. Pai M. Alternatives to the tuberculin skin test: Interferon-gamma assays in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection. Indian J Med Microbiol 2005; 23: 151 - 8
5. Kang YA, Lee HW, Yoon HI, Cho BL, Han SK, Yim JJ, et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country JAMA 2005; 293: 2756 - 61
6. McHugh TD, Pope CF, Ling CL, Patel S, Billington OJ, Gillespie SH, et al. Prospective evaluation of BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of tuberculosis in non-respiratory and respiratory samples. J Med Microbiol 2004; 53: 1215 - 9
7. Brodie D, Schluger NW. The diagnosis of tuberculosis. Clin Chest Med 2005; 26: 247 - 71
8. Lemaitre N, Armand S, Vachee A, Capilliez O, Dumoulin C, Courcol RJ. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *M. tuberculosis* direct test for detection of *M. tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. J Clin Microbiol 2004; 42: 4307 - 9
9. Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, Zingale A, Brambilla AM, Malnati MS, et al. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *M. tuberculosis* load by two realtime calibrated PCR assays. J Clin Microbiol 2003; 41: 4565 - 72
10. Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. Eur Respir J 2005; 26: 339 - 50
11. Hazbon MH. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. Biomedica 2004; 24(Suppl): 149 - 62

12. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *M. tuberculosis:* a systematic review and meta－analysis. BMC Infect Dis 2005; 5: 62
13. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *M. tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2005; 43: 3699 - 703
14. Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S, Roudinskii N, Donnikov M, Mirzabekov A, et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug－resistant *M. tuberculosis.* Clin Microbiol Infect 2005; 11: 531 - 9
15. Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. Direct detection of rifampin－ and isoniazidresistant *M. tuberculosis* in auramine－rhodamine－positive sputum specimens by real－time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42: 1585 - 9
16. Pai M, Kalantri S, Pascopella L, Riley LW, Reingold AL. Bacteriophage based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *M. tuberculosis*: a meta－analysis. J Infect 2005; 51: 175 - 87
17. Hazbon MH, Guarin N, Ferro BE, Rodriguez AL, Labrada LA, Jacobs WR Jr., et al. Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *M. tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2003; 41: 4865 - 9

Peer Reviewer Commentary

이 관 호 (영남의대　내과)

본 논문은 최근 면역학과 분자생물학의 발전에 따른 잠복결핵의 진단, 결핵균 확진 및 약제내성 결핵의 진단에 대한 새로운 진단법에 대한 논문이다. 우리나라에서는 오래 전부터 매 5년마다 전국결핵실태조사를 하여 오다가 2000년부터는 실태조사의 목적을 달성한 것으로 보고 더 이상 조사를 하지 않고 있다. 그러나 실제 임상 일선에서는 최근 결핵이 증가되고 있다는 의견이 많다. 또한 초기 결핵부터 약제내성 결핵의 빈도가 증가되고 있고 비결핵성 마이코박테리아의 빈도가 증가되고 있는 실정이다. 이와 같은 시점에서 결핵의 새로운 진단법의 개발과 보급이 필요하겠으며, 본 논문은 시기적절한 논문으로 판단된다. 그러나 현재까지의 새로운 결핵진단법은 비결핵성 결핵균의 진단에는 부적합하고, 검사법이 복잡하며, 검사비용이 비싼 문제점이 있으므로 앞으로 이와 같은 문제점에 대한 개선이 필요하겠다.