

Performance Evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM and MDR-TB Detection Kit for Detection of Mycobacteria and for Anti-Tuberculosis Drug Susceptibility Test

Jun Hyung Lee, Bo Hyun Kim, Mi-Kyung Lee

Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The Anyplex plus MTB/NTM and MDR-TB Detection kits (Seegene, Korea) a real-time PCR assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and nontuberculous mycobacteria (NTM) and for identification of rifampin (RIF) and isoniazid (INH) resistance of MTB in various specimens. We evaluated the diagnostic performance of the Anyplex plus MTB/NTM and MDR-TB Detection kit.

Methods: To determine the ability of the kit to detect MTB and NTM, 557 samples were tested. The diagnostic performance of the Anyplex plus MTB/NTM Detection kit was determined based on the results of culture, nucleic acid amplification tests (NAAT), radiologic analysis, and clinical features suggestive of mycobacterial infection. The performance of the kit was compared with those of other real-time PCR kits. For the drug susceptibility test (DST), 51 MTB isolates were tested. The diagnostic performance of the Anyplex plus MDR-TB Detection kit was determined based on the conventional DST and compared with other molecular DST kits.

Results: Sensitivity and specificity for MTB detection of the Anyplex plus MTB/NTM Detection kit were 82.9% (63/76) and 99.4% (478/481), respectively, while those for NTM detection were 76.5% (13/17) and 89.6% (484/540). Sensitivity and specificity for RIF resistance detection of the Anyplex plus MDR-TB Detection kit were 100% (3/3) and 97.9% (47/48), respectively, while those for INH resistance detection were 83.3% (5/6) and 100% (45/45).

Conclusion: The Anyplex plus MTB/NTM Detection kit showed good diagnostic performance for detection of MTB and NTM. Especially in MTB-positive cases, the Anyplex plus MDR-TB Detection kit provided rapid and reliable results of drug resistance to RIF and INH. (*Ann Clin Microbiol* 2014;17:115-122)

Key Words: Anyplex plus, Molecular diagnostic techniques, Multidrug-resistant tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Nontuberculous Mycobacteria

INTRODUCTION

결핵의 조기 치료를 위해서는 무엇보다 먼저 신속하고 정확하게 진단하는 것이 중요한데, 결핵 감염을 진단하기 위한 여러 검사법 중 짧은 시간 내에 비교적 정확한 검사결과를 얻을 수 있는 분자진단 검사법이 이런 목적에 잘 부합한다. 여러 분자진단 검사법 중 결핵균에만 특이하게 존재하는 핵산을 증폭하여 확인하는 핵산증폭검사(nucleic acid amplification test, NAAT)가 널리 쓰이고 있고, 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)은 그 대표적인 예이다. 또한 내성결핵은 치료가 힘들고 다른 사람에게 내성결핵균을 전파시킬 수 있기 때문에, 내성결핵 여부가 결핵의 치료방침을 정하는 데 매우

중요한 정보가 된다. 항결핵제 감수성 검사는 내성결핵을 검출하여 적절한 치료를 받게 하고 추가적인 내성결핵의 발생 및 전파를 예방하는데 필수적이다[1]. 그러나 전통적인 항결핵제 감수성 검사는 결핵균 배양 후 추가로 4주 이상의 시간이 소요되므로, 항결핵제 내성을 일으키는 유전자 변이를 검출하여 신속하게 내성 여부를 예측하는 분자진단 검사의 이용이 증가하고 있다.

최근 핵산 추출과정도 간단하고, 결핵균 검출과 동시에 다제약제 내성여부까지 간편한 방법으로 빠른 시간 내에 확인할 수 있는 Anyplex plus MTB/NTM Detection 키트와 Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene, Seoul, Korea) 키트가 개발되었다. 이 두 가지 키트는 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR) 검사

Received 15 October, 2014, Revised 13 November, 2014, Accepted 27 November, 2014

Correspondence: Mi-Kyung Lee, Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Heukseok-ro 102, Dongjak-gu, Seoul 156-755, Korea. (Tel) 82-2-6299-2719, (Fax) 82-2-6298-8630, (E-mail) cpworld@cau.ac.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© 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.

법으로서, Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트는 결핵균의 *is6110*과 *mpb64*, 항산균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 시발체(primer)를 사용하여, 객담(sputum), 폐포세척액(bronchial washing), 체액(body fluid), 생검 조직(fresh tissue) 등 다양한 검체에서 직접 결핵균 및 비결핵항산균을 검출할 수 있도록 개발되었다. Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene) 키트는 rifampin (RIF) 내성에 관련된 15가지 돌연변이와 isoniazid (INH) 내성에 관련한 6가지 돌연변이를 동시에 검출할 수 있도록 고안되었고, Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트의 증폭산물을 검사에 이용하므로 결핵균 검출 후 내성 여부를 확인하는데 약 40분 정도만 추가로 소요되는 것이 큰 장점이다.

본 연구에서는 MTB/NTM 및 MDR-TB 검출을 위한 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 및 Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene) 키트의 유용성을 평가하고자 기존에 사용되고 있는 MTB/NTM 검사들 및 항결핵제 내성 검사들과 비교하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상

2012년 4월부터 7월까지 중앙대학교병원 진단검사의학과에 항산균 염색, 배양 및 결핵균 PCR 검사가 의뢰된 총 416명 환자의 557개의 검체(호흡기 검체: 402개, 비호흡기 검체: 155개)를 대상으로 결핵균 검출율을 평가하였다. 호흡기 검체는 객담과 기관지 폐포세척액이 대부분이었고, 비호흡기 검체는 골수 천자, 농양, 뇌척수액, 늑막액, 복막액, 소변, 관절액 등이 포함되었다. 이 검체들 중 배양에 성공하고 대한결핵협회 결핵연구원(The Korean Institute of Tuberculosis)의 통상적 항결핵제 감수성 검사 결과를 얻을 수 있었던 51개 결핵균 양성검체에 대해서는 항결핵제 내성 검출율을 평가하였다. 본 연구는 중앙대학교병원 생명윤리위원회(institutional review board)의 승인을 받았다.

2. 항산균 도말 검사와 배양

항산균 도말 검사(acid-fast bacilli smear, AFB smear)와 배양은 대한임상미생물학회의 결핵검사지침에 따라 다음과 같이 시행하였다[2]. 객담이나 소변과 같이 오염의 가능성이 있는 검체는 0.5% NALC/5% NaOH (N-acetyl-L-cysteine and sodium hydroxide) 혼합시약을 동량 첨가하여 전처리하였다. 항산균 염색은 auramine-rhodamine 형광 염색을 시행하였고, 양성이면 Ziehl-Neelsen 염색법으로 확인하였다. 항산균 도말 결과는 미국질병관리본부(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)의 기준에 따라 판정하였다[3].

항산균 배양을 위한 검체도 항산균 도말과 동일한 기준과 방법으로 전처리를 시행한 후 BACTEC MGIT 960 배양 튜브(Becton,

Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)와 2% Ogawa 배지(The Korean Institute of Tuberculosis, Cheongju, Korea)에 접종하였다. BACTEC MGIT 960 배양 튜브(Becton, Dickinson and Company)는 37°C에서 6주 동안 배양하였고, Ogawa 배지는 37°C에서 8주 동안 배양하였다. 액체 배지와 고체 배지 중에 한 개 이상의 배지에서 자란 경우 배양양성으로 판정하였다. 결핵균의 동정은 결핵균 특이항원 검사인 MPT64 (Standard Diagnostics, Yongin, Korea)를 이용하였다. 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)은 역교잡검사법(reverse blot hybridization)의 원리를 사용하는 MolecuTech REBA Myco-ID (YD Diagnostics, Yongin, Korea)와 AdvanSure Mycobacteria GenoBlot Assay (LG Life Sciences, Seoul, Korea)를 이용하여 동정하였다.

3. 양성 검체의 정의

- A. 결핵 배양 고체 배지나 액체 배지에서 배양 양성인 경우
- B. 결핵 배양 음성이지만 핵산증폭검사서 양성인 경우에는 (i) 다른 검체에서 항산균 배양 양성인 환자의 검체인 경우 (ii) 결핵치료를 받은 환자에서 검체를 얻은 경우 (iii) 임상 증상, 방사선학적 양성, 결핵 피부 반응 검사 양성, 조직학적 양성, 항결핵치료 후 개선된 경우를 포함한 결핵의 병력이 있는 환자에서 검체를 얻은 경우 등 상기 3가지 부가적인 기준에서 1개 이상 만족하는 경우로 정의하였다[4].

4. Anyplex plus MTB/NTM and MDR-TB Detection

Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 검사는 항산균 도말 및 배양에 이용한 검체와 동일한 시기에, 동일한 방법으로 채취한 별도의 검체를 이용하였고, 키트의 사용 설명서에 따라 검체에 동량의 전처리액(4% NaOH)을 첨가하여 전처리하였다. 항산균 DNA 추출을 위해 전처리 후 남아있는 침전물을 1.5 mL 튜브에 옮기고 1 mL의 멸균수를 넣고, 15,000×g에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하였다. 여기에 DNA 추출용액 100 μ L를 넣고 30초간 교반기로 잘 섞은 다음 100°C에서 20분간 가열하였다. 이후 15,000×g에서 5분간 원심분리하고 분리된 상청액 5 μ L를 PCR에 사용하였다. PCR 반응은 PCR master mix가 15 μ L씩 분주되어 있는 PCR 튜브에 각 검체에서 추출한 핵산을 5 μ L 넣은 후 CFX96 Real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 50°C에서 5분, 95°C에서 15분의 변성 단계 후 95°C에서 30초, 60°C에서 1분의 PCR 주기를 45회 반복하였다. 결핵균과 항산균 각각에 특이적인 시발체를 이용한 PCR 반응의 검출에는 3개의 채널(MTB, Mycobacteria, internal control)을 이용하여 각 채널에서 FAM, HEX, Quasar 670 파장의 신호형성을 확인하여 MTB와 internal control은 C_T 값이 45 이하일 때를, Mycobacteria는 C_T 값이 40 이하일 때를 양성으로 판정하였다. 제조사의 지침서대로 MTB만 양성 또는 MTB와 Mycobacteria 동시 양성인 경우에는 결핵균으로 판정하고,

Mycobacteria만 양성일 경우는 NTM으로 판정하였다.

항결핵제 내성 검출을 위한 Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene) 검사에는 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 검사로 생성된 PCR 증폭산물을 이용하였다. MDR-TB PCR Mastermix가 19 μ L씩 분주되어 있는 PCR 튜브에 PCR 증폭산물을 1 μ L 넣은 후 CFX96 Real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 이용하여 95°C에서 2분의 변성 단계 후 95°C에서 20초, 64°C에서 30초, 75°C에서 10초의 PCR 주기를 23회 반복하였다. RIF, INH 저항성을 보이는 변이, 즉, *rpoB* (β -subunit of RNA polymerase)와 *katG* (catalase-peroxidase) 유전자 부위 및 *inhA* (enoyl-acyl carrier protein reductase)의 촉진자(promoter) 부위의 변이에 각각 특이적인 시발체를 이용한 PCR 반응의 검출에는 3개의 채널(RIF-R, INH-R, internal control)을 이용하여 각 채널에서 FAM, Cal Red 610, Quasar 670 파장의 신호형성을 확인하여 RIF-R, INH-R 각각의 C_T 값이 23 이하일 때를 저항성으로 판정하였다. Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene) 검사의 검출 대상이 되는 유전자 변이(RIF 내성 15개, INH 내성 6개)는 Table 1에 정리하였다.

5. Advansure TB/NTM real-time PCR and MDR-TB GenoBlot Assay

결핵균 검출능에 대한 비교를 위해 Advansure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences) 키트를 이용하였다. Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 검사의 전처리와 완료된 검체를 분주하여 이용하였고 이후 과정은 제조사의 설명서에 따라 진행하였다. PCR 반응의 검출에는 3개의 채널(MTB, Mycobacteria, internal control)을 이용하여 각 채널에서 FAM, HEX, Cy5 파장의 신호형성을 확인하여 C_T 값이 35 미만일 때를 양성으로 판정하였다. 제조사의 지침서대로 각 신호에서 MTB의 C_T 값이 Mycobacteria의 C_T 값보다 작거나 같으면 결핵균으로 판정하고, 큰 경우에는 결핵균과 NTM의 동시 감염의 가능성이 있는 것으로 해석하였다. Mycobacteria의 C_T 값만이 35 미만인 경우에는 NTM으로 해석하였다.

항결핵제 내성 검출능에 대한 비교를 위해서는 Advansure MDR-TB GenoBlot Assay (LG Life Sciences)를 이용하였다. 배양

에 성공하고 통상적 항결핵제 감수성 검사 결과를 얻을 수 있었던 51개 결핵균주를 제조사의 지침에 따라 검사하였다. 즉, *rpoB*와 *katG* 유전자 부위 및 *inhA*와 *ahpC* (alkyl hydroperoxide reductase)의 촉진자(promoter) 부분을 증폭하였고, 이때 증폭된 DNA에 바이오틴(biotin)을 표지하여 *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*의 야생형 또는 변이형으로 구성된 나일론 멤브레인-흡착 탐색자(probe)에 교잡시켰다. 교잡 여부는 자동화 분석 장비인 AdvanSure GenoScan (LG Life Sciences)을 이용하여 측정하였다. 제조사의 지침에 따라, 우선 야생형 때의 농도와 변이형 때의 농도 중 하나라도 2 이상일 경우에는, 변이형 때의 농도와 야생형 때의 농도의 비를 구해서 그 값이 1 이상일 때 그 약제에 대한 내성으로, 1 미만일 때는 감수성으로 판독하였다.

6. 통상적 항결핵제 감수성 검사

통상적 항결핵제 감수성 검사를 위해 결핵연구원의 감수성 검사와 자동화 액체배양 감수성 검사(automated liquid culture system)를 시행하였다. 결핵연구원에서는 RIF과 INH가 각각 기준 농도(critical concentration)인 40 μ g/mL와 0.2 μ g/mL씩 포함된 Löwenstein-Jensen (L-J) 배지를 이용하여 절대농도법(absolute concentration method)으로 감수성 검사를 실시하였다. 본원에서 시행한 자동화 액체배양 감수성 검사에는 BACTEC MGIT 960 액체배지(Becton, Dickinson and Company)를 이용하였는데, 항결핵제를 포함하지 않은 대조배지(growth control)의 성장지수(growth unit)가 400에 도달하였을 때, 항결핵제(RIF 1.0 μ g/mL, INH 0.1 μ g/mL)를 포함한 배지의 성장지수가 100 이상이면 내성으로 판정하였다. 결핵연구원의 감수성 검사 결과와 본원의 자동화 액체배양 감수성 검사 결과가 불일치할 경우는 결핵연구원의 감수성 검사 결과를 따랐다.

7. DNA 염기서열분석

Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene) 키트와 통상적 항결핵제 감수성 검사의 결과가 일치하지 않는 군주들에 대해서는 추가로 DNA 염기서열분석을 실시하였다. 염기서열분석은 Anyplex plus MTB/NTM (Seegene) 검사의 PCR산물에 대해 *rpoB*, *katG*, *inhA* 유전자에 각각 특이적인 시발체를 이용하여

Table 1. Mutation targets in Anyplex plus MDR-TB Detection kit

Drug-resistance	Related gene	Mutation targets			
Rifampin-resistance	<i>rpoB</i>	L511P (CTG→CCG)	Q513L (CAA→CTA)	3 a.a. deletion in 513-516	D516G (GAC→GGC)
		D516V (GAC→GTC)	D516Y (GAC→TAC)	S522L (TCG→TTG)	H526D (CAC→GAC)
		H526L (CAC→CTC)	H526N (CAC→AAC)	H526R (CAC→CGC)	H526Y (CAC→TAC)
		S531L (TCG→TTG)	S531W (TCG→TGG)	L533P (CTG→CCG)	
Isoniazid-resistance	<i>katG</i>	S315N (AGC→AAC)	S315T (AGC→ACC)	S315T (AGC→ACA)	
	<i>inhA</i> promoter	-8 (T→A)	-15 (C→T)	-17 (G→T)	

Abbreviation: a.a., amino acid.

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)로 시행하였으며, 염기서열분석 결과는 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 자료와 비교하였다.

8. 통계분석

민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도의 계산에는 Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) 프로그램을 사용하였다. 두 검사법 간의 민감도 비교에는 카이제곱검정(χ^2 test)을 이용하였으며, 유의수준 0.05 미만인 경우($P < 0.05$) 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

RESULTS

총 557개의 검체에서 결핵균과 NTM의 양성 검체는 각각 76개(호흡기 검체 60, 비호흡기 검체 16)와 17개(호흡기 검체 16, 비호흡기 검체 1)로 모두 93개였으며, 결핵균과 NTM이 동시에 배양된 경우는 없었다(Table 2). 검체의 종류에 따른 결핵균 검출률은 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트의 경우 호흡기 검체에서는 88.3% (53/60), 비호흡기 검체에서는 81.3% (13/16)를 보였고, AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences)의 경우는 각각 90.0% (54/60), 93.8% (15/16)의 검출률을 보였다.

결핵균 검출에 있어서 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트의 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도는 각각 82.9%, 99.4%, 95.5%, 97.4%였다(Table 3). AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences)의 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도는 각각 89.5%, 99.8%, 98.6%, 98.4%였다. 항산균 도말 양성 검체를 대상으로 할 경우 Anyplex plus

MTB/NTM (Seegene)의 민감도는 91.7%, AdvanSure TB/NTM (LG Life Sciences)의 민감도는 100.0%였다. NTM 검출에 있어서 Anyplex plus MTB/NTM (Seegene)의 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도는 각각 76.5%, 89.6%, 18.8%, 99.2%였고, AdvanSure TB/NTM (LG Life Sciences)은 각각 41.2%, 98.9%, 53.9%, 98.2%의 성능을 보였다.

단지 배양결과만을 기준으로 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트의 결핵균 검출률을 평가하였을 경우 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도는 각각 88.5%, 96.0%, 69.7%,

Table 2. Detection frequencies of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria

Decision*	Organisms	No. case (%)
Positive	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	76 (13.6)
	Nontuberculous mycobacteria	17 (3.1)
	<i>M. avium</i>	6
	<i>M. intracellulare</i>	5
	<i>M. abscessus</i>	1
	<i>M. flavescens</i>	1
	<i>M. massiliense</i>	1
	Not identified	3
Negative		464 (83.3)
Total		557 (100.0)

*True-positive specimens were defined as those that met the following criteria: (a) culture positive on 2% Ogawa medium and/or in the BACTEC MGIT 960 system; or (b) culture negative but positive in NAAT, provided one or more of the following additional criteria were met: (i) the specimen originated from a patient whose other specimens were culture positive; (ii) the specimen originated from a patient receiving TB treatment; (iii) the specimen originated from a patient whose history of TB included clinical symptoms, positive radiographic findings, positive Mantoux tuberculin skin test, positive histology, and improvement under treatment with anti-TB chemotherapy.

Table 3. Performance of Anyplex plus MTB/NTM Detection and AdvanSure TB/NTM real-time PCR

Target	AFB smear	Assay	Positive sample*		Negative sample		Sensitivity (95% CI)/ Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)/ NPV (95% CI)
			PCR +	PCR -	PCR +	PCR -		
MTB	All	Anyplex plus	63	13	3	478	82.9 (72.5-90.6)/99.4 (98.2-99.9)	95.5 (87.3-99.1)/97.4 (95.5-98.6)
		AdvanSure	68	8	1	480	89.5 (80.3-95.3)/99.8 (98.9-100.0)	98.6 (92.2-99.9)/98.4 (96.8-99.3)
	Positive	Anyplex plus	11	1	0	0	91.7 (61.5-99.8)/NA	100.0 (71.5-100.0)/0.0 (0.0-97.5)
		AdvanSure	12	0	0	0	100.0 (73.5-100.0)/NA	100.0 (73.5-100.0)/NA
	Negative	Anyplex plus	52	12	3	478	81.3 (69.5-89.9)/99.4 (98.2-99.9)	94.6 (84.9-98.9)/97.6 (95.8-98.7)
		AdvanSure	56	8	1	480	87.5 (76.9-94.5)/99.8 (98.9-100.0)	98.3 (90.6-100.0)/98.4 (96.8-99.3)
NTM	All	Anyplex plus	13	4	56	484	76.5 (50.1-93.2)/89.6 (86.7-92.1)	18.8 (10.4-30.1)/99.2 (97.9-99.8)
		AdvanSure	7	10	6	534	41.2 (18.4-67.1)/98.9 (97.6-99.6)	53.9 (25.1-80.8)/98.2 (96.7-99.1)
	Positive	Anyplex plus	0	0	1	11	NA/91.7 (61.5-99.8)	0.0 (0.0-97.5)/100.0 (71.5-100.0)
		AdvanSure	0	0	0	12	NA/100.0 (73.5-100.0)	NA/100.0 (73.5-100.0)
	Negative	Anyplex plus	13	4	55	473	76.5 (50.1-93.2)/89.6 (86.7-92.1)	19.1 (10.6-30.5)/99.2 (97.8-99.8)
		AdvanSure	7	10	6	522	41.2 (18.4-67.1)/98.9 (97.5-99.6)	53.9 (25.1-80.8)/98.1 (96.6-99.1)

*Criteria of positive sample is the same as Table 2.

Abbreviations: CI, confidence interval; PPV, positive-predictive value; NPV, negative-predictive value; Anyplex plus, Anyplex plus MTB/NTM Detection; AdvanSure, AdvanSure TB/NTM real-time PCR; MTB, *M. tuberculosis*; NTM, nontuberculous mycobacteria; NA, not applicable.

Table 4. Culture based performance of Anyplex plus MTB/NTM Detection and Advansure TB/NTM real-time PCR

Target	Assay	Culture positive*		Culture negative		Sensitivity (95% CI)/ Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)/ NPV (95% CI)
		PCR +	PCR -	PCR +	PCR -		
MTB	Anyplex plus	46	6	20	485	88.5 (76.6-95.7)/96.0 (94.0-97.6)	69.7 (57.2-80.4)/98.8 (97.4-99.6)
	Advansure	50	2	19	486	96.2 (86.8-99.5)/96.2 (94.2-97.7)	72.5 (60.4-82.5)/99.6 (98.5-100.0)
NTM	Anyplex plus	9	7	60	481	56.3 (29.9-80.3)/88.9 (86.0-91.4)	13.0 (6.1-23.3)/98.6 (97.1-99.4)
	Advansure	4	12	9	532	25.0 (7.3-52.4)/98.3 (96.9-99.2)	30.8 (9.1-61.4)/97.8 (96.2-98.9)

*Culture positive on 2% Ogawa medium and/or in the BACTEC MGIT 960 system.

Abbreviations: CI, confidence interval; PPV, positive-predictive value; NPV, negative-predictive value; Anyplex plus, Anyplex plus MTB/NTM Detection; Advansure, Advansure TB/NTM real-time PCR.

Table 5. Performance of Anyplex plus MDR-TB Detection and Advansure MDR-TB GenoBlot Assay on detection of anti-tuberculosis resistance

Drug	Assay	Resistant isolates*		Susceptible isolates		Sensitivity (95% CI)/ Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)/ NPV (95% CI)
		R [†]	S	R [†]	S		
Rifampin	Anyplex plus	3	0	1	47	100.0 (29.2-100.0)/97.9 (88.9-100.0)	75.0 (19.4-99.4)/100.0 (92.5-100.0)
	Advansure	3	0	1	47	100.0 (29.2-100.0)/97.9 (88.9-100.0)	75.0 (19.4-99.4)/100.0 (92.5-100.0)
Isoniazid	Anyplex plus	5	1	0	45	83.3 (35.9-99.6)/100.0 (92.1-100.0)	100.0 (47.8-100.0)/97.8 (88.5-99.9)
	Advansure	5	1	0	45	83.3 (35.9-99.6)/100.0 (92.1-100.0)	100.0 (47.8-100.0)/97.8 (88.5-99.9)

*Resistant isolates were determined by conventional drug susceptibility test; [†]Resistance was determined by each molecular based assay.

Abbreviations: R, resistant; S, susceptible; CI, confidence interval; PPV, positive-predictive value; NPV, negative-predictive value; Anyplex plus, Anyplex plus MTB/NTM Detection; Advansure, Advansure TB/NTM real-time PCR.

Table 6. Discrepancies between molecular and conventional drug susceptibility test

Sample No.	Drug	Molecular DST			Conventional DST	
		Anyplex plus MDR-TB	Advansure MDR-TB	Sequencing	Absolute concentration method*	Automated liquid culture [†]
7	Rifampin	R	R	<i>rpoB</i> S531L	R	R
	Isoniazid	S	S	wild	R	R
47	Rifampin	R	R	<i>rpoB</i> L533P	S	S
	Isoniazid	S	S	wild	S	S

*Absolute concentration method used L-J media; [†]Automated liquid culture used BACTEC MGIT 960 system.

Abbreviations: Anyplex plus MDR-TB, Anyplex plus MDR-TB Detection; Advansure MDR-TB, Advansure MDR-TB GenoBlot Assay; DST, Drug Susceptibility Test; S, susceptible; R, Resistant.

98.8%였고, AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences)의 경우는 순서대로 96.2%, 96.2%, 72.5%, 99.6%였다 (Table 4).

51개 배양양성 결핵균주에 대하여 통상적 항결핵제 감수성 검사 결과를 바탕으로 Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene)의 항결핵제 내성 검출능을 평가한 결과는 Table 5와 같다. RIF 내성 검출에 있어서 Anyplex plus MDR-TB Detection 키트의 민감도, 특이도, 내성예측률, 감수성예측률은 각각 100.0%, 97.9%, 75.0%, 100.0%였고, Advansure MDR-TB Genoblot Assay (LG Life Sciences)도 이와 동일하였다. Isoniazid 내성 검출에 있어서는 Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene) 키트의 민감도, 특이도, 내성예측률, 감수성예측률은 83.3%, 100.0%, 100.0%,

97.8%였고, Advansure MDR-TB (LG Life Sciences)에서도 이와 동일한 결과를 보였다. 항결핵제 내성에 대한 분자진단 검사와 통상적 항결핵제 감수성 검사 결과 간 불일치를 보인 경우는 RIF과 INH 내성에 있어 각각 하나씩 총 2 균주가 관찰되었는데, Table 6의 7번 균주의 경우 2종의 분자진단 검사에서는 모두 INH 감수성일 것으로 예상되었으나 통상적 항결핵제 감수성 검사 결과 내성 균주였고, 47번 균주의 경우 2종의 분자진단 검사에서는 모두 RIF 내성일 것으로 예상되었으나, 통상적 항결핵제 감수성 검사 결과 감수성 균주로 확인되었다.

DISCUSSION

결핵을 조기진단하고 치료를 시작하는 것은 공중보건과 의료의 관점에 있어 매우 중요하며, 조기 진단을 위해 핵산증폭 검사를 사용하는 것은 보건당국 뿐만 아니라 임상 진료의와 환자에게 상당한 이득을 가져다 준다[5]. 결핵 진단에 있어 핵산 증폭검사의 민감도와 특이도에 대해서 여러 연구가 있어 왔는데, 호흡기 검체를 대상으로 Anyplex MTB PCR 키트(Seegene)를 평가한 다른 연구에서는 전체 검체를 대상으로 했을 때 민감도 80.2%, 특이도 98.2%, 도말 양성 검체를 대상으로 했을 때 민감도 95.2%, 특이도 72.7%를 보고한 바 있다[6]. 본 연구에서는, 전체 검체를 대상으로 했을 때 민감도 82.9%, 특이도 99.4%, 도말 양성 검체를 대상으로는 민감도 91.7%로 분석되었다. 앞서 언급한 연구와 비교할 때, 전체 검체를 대상으로 했을 때 두 연구의 민감도와 특이도는 상당히 유사하나, 도말 양성 검체에 대한 민감도는 본 연구에서 약간 감소하였다. 이는 항산균 도말 검사에서 약양성(1-2/30 fields)을 보이고 결핵균이 배양된 검체 1건이 Anyplex plus MTB/NTM (Seegene) 검사에서 NTM에 해당하는 형광강도를 보여 NTM으로 판정된 결과로 생각된다.

항산균 도말 검사는 결핵균의 검출을 위해 가장 널리 쓰이는 기본적인 검사이지만, 민감도와 특이도가 낮은 단점을 갖고 있다. 본 연구에서 항산균 도말 검사의 민감도는 12.9% (95% 신뢰구간: 6.9%, 21.5%)에 불과하여 기존에 보고된 다양한 민감도 52%-97%에 비교해서도 상당히 낮았다[7]. 이는 본 연구의 양성검체 판정이 단순 배양양성 뿐만 아니라 핵산증폭검사 결과와 다양한 임상병력을 고려하였기 때문일 것으로 생각된다. 항산균 도말 검사의 특이도는 본 연구에서 100% (95% 신뢰구간: 99.2%, 100.0%)로 기존에 보고된 연구들과 유사하였다[7].

비교 평가한 다른 핵산증폭검사인 Advansure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences) 검사는 전체 검체를 대상으로 했을 때 결핵균 검출의 민감도가 89.5%로서, Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 검사의 82.9%에 비해 좀더 높은 민감도를 보였으나, 두 검사 간에 통계적으로 의미있는 차이는 보이지 않았다(χ^2 test, $P=0.24$).

NTM 검출에 있어서 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트는 민감도 76.5%로서 비교 평가한 Advansure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences) 키트의 41.2%에 비해 더 높은 민감도를 보였고, 두 검사 간에 통계적으로도 의미있는 차이를 보였다(χ^2 test, $P=0.04$). Advansure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences) 검사의 NTM 검출 민감도는 다른 연구에서는 75%로 보고된 바 있는데[8], 본 연구와 동일한 양성검체 판정기준을 사용한 연구였으므로 양성검체 판정기준에 의한 차이는 아닐 것으로 생각되며, Advansure TB/NTM real-time PCR (LG Life Sciences) 키트의 NTM 검출 민감도에 대해서는 추가적

인 연구가 필요하다고 생각된다. 두 키트 간 NTM 검출 민감도 차이가 발생한 원인으로는 PCR 검사의 반복횟수에 있어 Anyplex plus MTB/NTM (Seegene) 검사는 40회, Advansure TB/NTM (LG Life Sciences) 검사는 35회로서 Anyplex plus의 반복횟수가 더 많다는 점과 사용된 시발체의 차이 등을 생각해 볼 수 있겠다. 단, NTM 검출에 있어 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트의 양성예측도는 18.8%에 불과한 것으로 나타났는데, 이는 본 연구에서의 NTM 유병률(3.1% in Table 2)에 의한 영향을 고려하더라도 결과해석에 있어 주의가 필요할 것으로 사료된다.

결핵균의 항결핵제 내성의 원인으로는 *rpoB*, *katG*, 또는 *inhA* 유전자의 소실 또는 변이가 알려져 있는데, RIF는 RNA 중합효소에 결합하여 전사(transcription)와 RNA 연장(prolongation)을 방해하는 기전으로 작용하며 항산균의 RNA 중합효소의 베타사슬(beta chain)을 부호화하는 *rpoB* 유전자의 변이가 RIF 내성을 일으키게 된다[9]. 기존 연구에 따르면 RIF 내성은 *rpoB* 유전자의 변이로 96-98%까지 잘 설명된다고 알려져 있다[10].

INH 내성에 있어서는 *katG* 유전자가 항산균의 과산화수소분해효소(catalase)를 부호화(encoding)하는데, INH는 과산화수소분해효소에 의해 전구체(prodrug)에서 활성형(functional form)으로 전환되기 때문에 과산화수소분해효소 유전자(*katG*)의 소실이나 변이는 INH 내성을 유발하며, INH 내성균주에서 적게는 10-25% 부터 많게는 42-58%까지 발견된다고 알려져 있다[10-12]. *inhA* 유전자는 항산균의 세포벽을 구성하는 주요 성분인 mycolic acid의 합성에 관여하는 long-chain enoyl-acyl carrier protein reductase를 부호화하며, INH는 *inhA* 단백질에 결합하여 항산균의 세포벽 합성을 억제하는 기전으로 작용하는데 이 유전자의 촉진자(promoter) 부위의 변이는 INH 내성균주의 21-34%에서 발견된다[10,13,14].

본 연구에서 항결핵제 내성 분자진단 검사와 통상적 항결핵제 감수성 검사 간 불일치, 즉 유전형과 표현형의 불일치는 RIF, INH에 대해서 각각 하나씩 관찰되었는데, Table 6의 7번 균주의 경우 Anyplex plus MDR-TB (Seegene)와 Advansure MDR-TB (LG Life Sciences) 키트에서 모두 INH 감수성으로 판정된 반면 결핵연구원의 절대농도법과 본원의 자동화 액체배양 감수성 검사에서는 INH 내성 균주로 확인되었다. 염기서열분석에서는 *katG*, *inhA* 유전자 부위에서 알려진 변이형이 관찰되지 않았다. 이 균주의 불일치 결과는 *katG*, *inhA* 등 기존에 알려진 유전자 변이 외 다른 기전으로 발생한 내성 때문일 것으로 판단된다. 또다른 불일치 균주인 Table 6의 47번 균주는 Anyplex plus MDR-TB (Seegene)와 Advansure MDR-TB (LG Life Sciences) 키트에서 모두 RIF 내성으로 판정되었는데, 결핵연구원의 절대농도법과 본원의 자동화 액체배양 검사 결과는 RIF 감수성 균주였다. 염기서열분석에서는 *rpoB* L533P 변이가 확인되었다. *rpoB* 유전자의 533번 코돈의 점돌연변이가 실제로 내성을 유발하는지에 대해서는 아직 논란의

여지가 있는데, 감수성(susceptible, MIC $\leq 1.0 \mu\text{g/mL}$)을 보였다는 연구[15,16]와 낮은 수준의 내성(low-level resistance, MIC=12.5 $\mu\text{g/mL}$)을 보였다는 연구[17], 그리고 고도의 내성(high-level resistance, MIC=512 $\mu\text{g/mL}$)을 보였다는 연구[18] 등 다양한 결과가 보고되어 있다. 따라서 47번 군주에서 관찰된 유전형과 표현형의 불일치는 분자진단 키트의 점돌연변이 검출능의 문제가 아니라 *rpoB* L533P 변이가 약제 내성에 미치는 영향이 다양하게 발현되기 때문인 것으로 판단된다.

결론적으로 Anyplex plus MTB/NTM Detection (Seegene) 키트는 결핵균 검출의 민감도와 특이도가 우수하며, 특히 비결핵항산균 검출의 민감도가 기존의 분자진단 검사에 비해 우수하여, 다양한 검체를 이용한 결핵과 비결핵항산균 감염증의 신속한 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. Anyplex plus MDR-TB Detection (Seegene) 키트는 결핵균 검출 후 그 증폭산물을 이용해서 검사를 시행하므로 검사가 편리하고 내성 여부를 매우 신속하게 확인할 수 있는 장점이 있다. RIF 내성 및 INH 내성 검출에 있어 기존 분자진단 검사와 동등한 성능을 보였으므로 항결핵제 내성 유무를 예측하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 (주)씨젠의 연구비 지원을 받아 수행되었음. 일부 검사 키트는 (주)LG생명과학과 벡톤디킨슨 코리아(주)에서 제공받았음.

REFERENCES

1. The Korean Society of Clinical Microbiology and Korea Centers for Disease Control and Prevention. Manual of Laboratory Tests for Tuberculosis (2013). <http://www.cdc.go.kr/CDC/cms/cmsFileDownload.jsp?fid=51&cid=21373&fieldName=attach1&index=1> [Online] (last visited on 16 December 2014).
2. The Korean Society of Clinical Microbiology and Korea Centers for Disease Control and Prevention. Practical Guidelines for Laboratory Diagnosis of Tuberculosis (2011). https://ksml.org/board/lib/down.php?boardid=board_notice&no=722 [Online] (last visited on 16 December 2014).
3. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1376-95.
4. 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;22:349-56.
5. Report of an expert consultation on the use of nucleic acid amplification tests for the diagnosis of tuberculosis: Centers for Disease Control and Prevention. http://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/amplification_tests/default.htm [Online] (last visited on 1 September 2012).
6. Lim J, Kim J, Kim JW, Ihm C, Sohn YH, Cho HJ, et al. Multicenter evaluation of Seegene Anyplex TB PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. J Microbiol Biotechnol 2014;24:1004-7.
7. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis 2006;6:570-81.
8. Hwang S, 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;14:55-9.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647-50.
10. Telenti A. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. Thorax 1998;53:793-7.
11. Heym B, Alzari PM, Honoré N, Cole ST. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 1995;15:235-45.
12. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Nature 1992;358:591-3.
13. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1994;263:227-30.
14. Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1998;279:98-102.
15. Ma X, Wang H, Deng Y, Liu Z, Xu Y, Pan X, et al. *rpoB* Gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong Province, China. J Clin Microbiol 2006;44:3409-12.
16. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:1053-6.
17. Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, Mizuguchi Y, Nakamura M, Koga T, et al. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 1996;144:103-8.
18. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, Wang H. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. J Clin Microbiol 2003;41:2209-12.

=국문초록=

결핵균 검출과 항결핵제 감수성 검사를 위한 Anyplex Plus MTB/NTM 및 MDR-TB Detection 키트의 성능 평가

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

이준형, 김보현, 이미경

배경: Anyplex plus MTB/NTM 및 MDR-TB Detection (Seegene, Seoul, Korea) 키트는 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용하여 다양한 검체로부터 결핵균과 비결핵항산균을 직접 검출하고 rifampin (RIF)과 isoniazid (INH)에 대한 내성을 검사할 수 있다. 본 연구에서는 Anyplex plus MTB/NTM 및 MDR-TB Detection 키트의 진단적 성능을 평가하였다.

방법: Anyplex plus MTB/NTM 키트의 결핵균 및 비결핵항산균 검출능을 평가하기 위해 557개의 임상검체를 검사하였다. Anyplex plus MTB/NTM Detection 키트의 진단적 성능은 배양검사, 핵산증폭검사, 방사선 소견 및 결핵감염의 임상소견을 종합한 결과에 기반하여 평가하였고, 다른 실시간 중합효소연쇄반응 검사키트와 비교했다. 항결핵제 감수성 검사를 위해서, 51개의 결핵 균주를 검사하였다. Anyplex plus MDR-TB Detection의 임상적 성능은 통상적 항결핵제 감수성 검사 결과를 기반으로 평가하였고, 다른 분자진단 항결핵제 감수성 검사 키트와 비교하였다.

결과: Anyplex plus MTB/NTM 키트의 결핵균 검출의 민감도와 특이도는 82.9% (63/76) and 99.4% (478/481)였고, 비결핵 항산균에 있어서는 각각 76.5% (13/17)와 89.6% (484/540)였다. Anyplex plus MDR-TB Detection 키트의 RIF 내성 검출에 있어서 민감도와 특이도는 100% (3/3)와 97.9% (47/48)였고, INH 내성 검출에 있어서는 각각 83.3% (5/6)와 100% (45/45)였다.

결론: Anyplex plus MTB/NTM Detection 키트는 결핵균 및 비결핵항산균 검출에 있어 우수한 성능을 보여주었다. 특히 결핵균 양성 검체에서, Anyplex plus MDR-TB Detection 키트는 RIF와 INH 내성에 대해 빠르고 신뢰할 만한 결과를 제공하였다. [Ann Clin Microbiol 2014;17:115-122]

교신저자 : 이미경, 156-755, 서울시 동작구 흑석로 102
중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 02-6299-2719, Fax: 02-6298-8630
E-mail: cpworld@cau.ac.kr