

Evaluation of the AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens

Jayoung Kim¹, Yeon-Joon Park¹, Nam Yong Lee², Chulhun L. Chang³, Miae Lee⁴, Jong Hee Shin⁵

Department of Laboratory Medicine, ¹College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, ²Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, ³Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan, ⁴Ewha Womans University Mokdong Hospital, Seoul, ⁵Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Background: We evaluated the performance of the AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay kit (AdvanSure MDR-TB, LG Life Science, Korea) to detect mutations related to rifampin (RFP)- and isoniazid (INH)-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens.

Methods: From February 2010 to June 2010, a total of 542 *M. tuberculosis* clinical isolates were collected from pulmonary tuberculosis patients in six university hospitals across Korea. We analyzed the conventional drug susceptibility testing (DST) and compared the results with those of the AdvanSure MDR-TB.

Results: Compared with the conventional DST, the overall agreement rates, sensitivity, and specificity were 98.2% (532/542), 84.6% (33/39), and 99.2% (499/503), respectively, for RFP resistance and

96.1% (521/542), 79.7% (59/74), 98.7% (462/468), respectively, for INH resistance. The three common *rpoB* mutations were *rpoB* S531L (53.8%), *rpoB* D516V (15.4%) and *rpoB* H526R (7.7%) in RFP-resistant strains. For INH resistance, the *katG* S315T mutation (58.1%) was the most common, followed by *inhA* C-15T (23.0%) and *katG* S315N (4.1%).

Conclusion: The AdvanSure MDR-TB showed high concordance with the conventional DST and would be helpful for early detection of RFP and INH resistance, although it requires improved sensitivity. (Korean J Clin Microbiol 2012;15:117-124)

Key Words: AdvanSure MDR-TB, Isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampin

서 론

2004년 WHO 보고에 따르면 우리나라 다제내성결핵(multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB)은 초기료 환자의 2.7%, 재치료 환자의 약 14%이며, 2000년대 이후에도 매년 약 4,000명 이상이 새로이 진단되는 것으로 추정된다[1-3]. MDR-TB는 치료에 실패할 가능성이 크기 때문에 약제내성결핵의 조기 발견은 치료에 매우 중요하다[3]. 이에 최근 개정된 2011년도 결핵진료지침에서는 모든 결핵 환자의 첫 배양분리 군주에 대해 항결핵제 감수성검사를 실시하고 MDR-TB가 의심되는 경우나 재치료시에는 전통적인 방법에 의한 약제 감수성검사와 신속 내성검사를 병용하여 시행하는 것을 권고하고 있다[4].

최근 들어 리팜핀(rifampin, RFP) 내성이 DNA dependant RNA polymerase의 β -subunit를 만드는 *rpoB* 유전자 변이와,

이소니아지드(isoniazid, INH) 내성이 *katG* (catalase peroxidase), *inhA* (inhibin alpha), *ahpC* (alkyl hydroperoxide reductase subunit C), *kasA* (ketoacyl-ACP synthetase)와 *ndh* (NADH dehydrogenase) 유전자 등의 변이와 관련이 있다는 것이 알려지면서 분자진단적 검사법들을 이용하여 항결핵제 내성 여부를 신속하고 정확하게 검출하는 방법들이 소개되었다[5-11].

최근 국내에서 개발된 AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay kit (이하 AdvanSure MDR-TB, LG 생명과학, 서울, 한국)는 reverse hybridization based line probe assay의 일종으로 결핵균 또는 AFB 도말 양성인 호흡기검체, 뇌척수액, 체액, 전혈, 조직 등의 검체로부터 결핵균 동정과 RFP, INH 내성을 동시에 검출하는 검사법이다. 본 연구에서는 호흡기 검체에서 분리된 결핵균을 대상으로 AdvanSure MDR-TB를 이용하여 RFP 및 INH 내성결핵을 검출하고 이를 절대농도법 결과와 비교, 평가하고자 하였다. 더불어 국내 결핵균의 RFP와 INH 내성유전자 분포를 분석함으로써 약제내성결핵의 실패과약을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

Received 31 May, 2012, Revised 17 September, 2012

Accepted 19 September, 2012

Correspondence: Yeon-Joon Park, Department of Laboratory Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul St. Mary's Hospital, 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea. (Tel) 82-2-2258-1640, (Fax) 82-2-2258-1719, (E-mail) yjpk@catholic.ac.kr

대상 및 방법

1. 대상

2010년 2월부터 7월 사이에 전국에 분포한 국내 6개 대학병원(가톨릭대학교 서울성모병원, 성균관대학교 삼성서울병원, 이화여자대학교 목동병원, 가톨릭대학교 대전성모병원, 전남대학교병원, 양산부산대학교병원)의 진단검사의학과에서 결핵균으로 동정된 542균주를 대상으로 하였다. 결핵균은 호흡기 검체에서 검출된 경우만을 대상으로 하였으며, 동일환자에서 중복채취된 균주는 검사대상에서 제외하였다. 결핵균 동정은 상품화된 중합효소연쇄반응법(PCR)인 Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor, Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA), AdvanSure TB/NTM real-time PCR kit (LG생명과학), Seeplex MTB/NTM ACE Detection (Seegene, Inc., 서울, 한국), MTB-ID V3 assay system (M&D, 원주, 한국), 또는 Real MTB-ID (YD Diagnostics, 용인, 한국)를 이용하여 시행하였다. 환자의 기본정보, 과거력, 초치료와 재치료의 구분은 병력지를 검토하여 후향적으로 조사하였으며, 과거에 항결핵제 치료를 받은 적이 없거나 4주 이내의 결핵 치료를 받았다면 초치료군으로 분류하였고, 4주 이상 결핵 치료를 받은 환자의 경우 재치료군으로 분류하였다[3,12]. 본 연구는 가톨릭대학교 중앙의료원 임상시험 심사위원회의 심의(IRB 3104-33)를 통과하였다.

2. AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay를 이용한 RFP, INH 내성 결핵균 검출

AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay kit는 다중 중합효소연쇄반응 후 *rpoB*와 *katG*, *inhA* 및 *ahpC* 유전자에 대한 증폭산물을 나일론 멤브레인-흡착 탐색자(probe)에 교잡시켰다. 교잡여부는 streptavidin-alkaline phosphatase (AP) conjugate를 첨가시켜 푸른 색의 발색을 관찰함으로써 확인하였고 푸른색으로 발색된 밴드 패턴은 자동화 분석 장비인 AdvanSure GenoScan을 이용하여 밴드의 발색 세기를 측정하였다. 스트립에는 결합대조군 밴드, 증폭대조군 밴드, 결핵균특이 밴드(TUB) 및 결핵균에 사용되는 야생형 ITS 염기서열과 하나의 염기만 불일치하는 TUB음성대조군 밴드 등 4개의 정도관리 밴드를 두었다. 각 유전자의 야생형(wild type)과 변이형(mutant type)을 탐색하기 위해 5개의 *rpoB* 야생형 밴드(RW1-RW5, 509-535 codon), 9개의 *rpoB* 변이형 밴드(RM11, L511P; RM12, Q513L; RM21, D516V; RM22, D516Y; RM3, S522L; RM41, H526Y; RM42, H526D; RM51, S531L; RM52, L533P), 1개의 *katG* 야생형 밴드(KW, 313-319 codon), 1개의 *katG* 변이형 밴드(KM, S315T), 1개의 *inhA* 야생형 밴드(IW, nucleic acid position -21), 1개의 *inhA* 변이형 밴드(IM, C-15T), 1개의 *ahpC* 야생형 밴드(AW, nucleic acid position -20), 2개의 *ahpC* 변이형 띠(AM1, G-6A;

AM2, C-10A) 등 총 21개의 밴드로 구성하였다. 결과 판독은 RFP와 INH의 각 locus별 야생형과 변이형 밴드 세기를 서로 비교하여 판정하였다. 제조사 지침에 따라 야생형 밴드와 변이형 밴드의 세기 중 하나라도 2이상이면 변이형 밴드의 세기와 야생형 밴드 세기 비(변이형 밴드의 세기/야생형 밴드의 세기)를 구해서 그 값이 1 이상이면 그 약제에 대한 내성으로, 그 이하면 감수성으로 판독하였다. RFP와 INH변이형 probe별 비가 0.9-1.1 사이거나 야생형 밴드와 변이형 밴드 세기가 모두 2 미만인 경우 재검하여, 재검에도 동일결과를 보이면 야생형 유전자 소실에 의한 약제내성으로 판단하였으며 염기서열분석을 시행하여 결과를 확인하였다.

3. 절대농도법을 이용한 항결핵제 감수성 검사 결과와의 비교

항결핵제 감수성검사는 대한결핵협회 결핵연구원에 의뢰하여 Löwenstein-Jensen (LJ) 고형배지를 이용한 절대농도법으로 시행하였다. 고체배지 혹은 액체배지에 배양된 균주를 멸균된 Phosphate buffer saline 혹은 생리식염수를 이용하여 균의 탁도가 McFarland 1이 되게 희석하였다. 이를 약제가 첨가되지 않은 배지(대조배지)와 각각의 약제가 첨가된 배지(약제배지)에 1 : 10으로 희석한 균액을 각각 접종하였다. 35-37°C에서 4주간 배양 후 대조배지와 비교하여 약제배지 집락수가 20개 이상 혹은 대조배지에 비해 1% 이상 증식한 경우 내성으로 판단하였다. 사용된 약제의 최종 농도는 RFP 40 µg/mL, INH 0.2 µg/mL이었다.

4. AdvanSure MDR-TB 결과와 절대농도법의 약제감수성검사 결과가 불일치할 때 추가적인 검사

AdvanSure MDR-TB 결과가 절대농도법에 의한 약제감수성 결과와 서로 불일치한 경우 절대농도법을 기준으로 판정하였다. 두 검사법 간에 RFP와 INH 중 하나라도 결과가 불일치하면 균주 혹은 DNA가 남아있어 추가 검사가 가능했던 검체를 대상으로 염기서열분석 및 BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)을 시행하였다. 염기서열분석은 독집자에 의뢰하여 시행하였으며 사용 primer는 Cho 등[10]의 연구를 따랐다. 증폭산물의 크기는 *rpoB* 유전자 245 bp 및 166 bp, *katG* 유전자 420 bp 및 205 bp, *inhA* 유전자 249 bp 및 190 bp, *ahpC* 유전자 359 bp였다. ABI 3130xl automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열분석을 시행하였으며 그 결과는 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 자료와 비교하였다.

MGIT는 삼성서울병원에 의뢰하여 시행하였다. 고체배지에서 자란 균주를 McFarland 0.5로 희석한 균액 혹은 액체배지에 배양된 균주를 식염수로 5배 희석한 균액을 만들었다. RFP (83 µg/mL)와 INH (8.3 µg/mL)를 MGIT tube에 분주하여 약제의

최종 농도가 각각 RFP 1.0 $\mu\text{g/mL}$, INH 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 가 되게 하였다. Oleic acid, bovine albumin, dextrose, catalase가 첨가된 OADC (Becton Dickinson) 용액이 든 MGIT tube에 미리 용해한 항균제와 균액을 첨가한 후 MGIT 960 system에서 37°C에서 배양하였다. 균 배양 감지 tube에서 균 양성 사인이 나오면 약제가 첨가된 두 tube에서의 균 발육 정도를 확인하여 약제가 든 tube에서 결핵균이 배양되면 내성으로, 균이 배양되지 않으면 감수성으로 판독하였다. RFP 및 INH 내성유전자형 분석은 절대농도법과 일치하는 경우 AdvanSure MDR-TB 검사 결과를 이용하였고, AdvanSure MDR-TB와 염기서열분석 간에 차이가 있던 것은 염기서열분석 결과를 이용하였다.

5. 통계

수집된 자료는 SPSS for window 11.0 (SPSS version 11.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 환자군에 따른 RFP, INH 내성유전자 비교는 Chi-square test를 이용하여 분석하였고 P 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의미가 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. AdvanSure MDR-TB와 절대농도법의 RFP, INH 내성 결과

AdvanSure MDR-TB의 내성검출민감도, 내성검출특이도, 내성예측률 및 감수성예측률은 RFP에서는 각각 84.6%, 99.2%, 89.2% 및 98.8%였고, INH에 대해서는 79.7%, 98.7%, 90.8% 및 96.9%였다(Table 1). AdvanSure MDR-TB와 절대농도법 간에 결과가 모두 일치하는 경우는 94.3% (511/542)였으며 RFP 검사일치도는 98.3% (532/542)였고 INH 검사일치도는 96.1% (521/542)였다. 두 검사법 간에 불일치를 보였던 31검체(RFP 10검체, INH 21검체) 중 30검체에서 염기서열분석을 시행하였고, 군주가 남아있던 20검체(RFP 불일치 7검체, INH 불일치 13검체)에서 MGIT 검사를 추가시행하였다(Table 2).

RFP 경우 AdvanSure MDR-TB RFP 위감수성이 6검체, 위내

성이 4검체였다. 그 중 RFP 위감수성 3검체는 MGIT에서도 내성이면서 염기서열분석에서 코돈 526CAC (His)가 CGC (Arg)로 치환된 *rpoB* H526R 변이가 관찰되었는데 AdvanSure MDR-TB에는 변이검출probe가 없는 변이형이었다. 나머지 위감수성 3검체는 염기서열분석도 RFP 위감수성이었다. RFP 위내성 4검체는 염기서열분석에서는 모두 변이형이 검출되었지만, 그 중 두 검체는 내성유전자형이 서로 달랐다. 한 검체는 AdvanSure MDR-TB는 *rpoB* H526D 및 H526Y 혼합변이였으나 염기서열분석은 *rpoB* H526N 변이였고, 다른 한 검체는 AdvanSure MDR-TB에서는 *rpoB* Q513L 변이였으나 염기서열분석은 *rpoB* P520L 변이였다. INH의 경우, AdvanSure MDR-TB INH 검사의 위감수성이 15검체, 위내성이 6검체였다. INH 위감수성 14검체에서 염기서열분석을 시행하였는데, 그 중 10검체는 염기서열분석에서도 야생형이었으나 나머지 위감수성 4검체는 염

Table 2. Discrepant findings of the four methods

Drugs	DST	AdvanSure MDR-TB mutation pattern	Sequencing mutation pattern	MGIT
RFP (n=10)	R	S	<i>rpoB</i> H526R	R
	R	S	<i>rpoB</i> H526R	R
	R	S	<i>rpoB</i> H526R	R
	R	S	S	S
	R	S	S	-
	R	S	S	-
	S	R, <i>rpoB</i> D516Y	<i>rpoB</i> D516Y	S
	S	R, <i>rpoB</i> Q513L	<i>rpoB</i> P520L	S
	S	R, <i>rpoB</i> H526Y, H526D	<i>rpoB</i> H526N	S
	S	R, <i>rpoB</i> S531L	<i>rpoB</i> S531L	-
INH (n=21)	R	WT	<i>katG</i> S315T	R
	R	WT	<i>katG</i> S315N	R
	R	WT	S	R
	R	WT	S	R
	R	WT	S	R
	R	WT	S	R
	R	WT	S	R
	R	WT	S	R
	R	WT	S	R
	R	WT	<i>katG</i> S315T	-
	R	WT	<i>katG</i> S315N	-
	R	WT	S	-
	R	WT	S	-
	R	WT	S	-
	R	WT	S	-
	R	WT	-	-
	S	r, <i>inhA</i> C-15T	<i>inhA</i> C-15T	R
	S	r, <i>inhA</i> C-15T	<i>inhA</i> C-15T	R
	S	r, <i>inhA</i> C-15T	<i>inhA</i> C-15T	R
	S	r, <i>inhA</i> C-15T	<i>inhA</i> C-15T	-
	S	r, <i>ahpC</i> C-10A	<i>ahpC</i> C-10T	S
	S	r, <i>ahpC</i> C-10A	<i>ahpC</i> C-10A	-

Table 1. Agreement rates between the conventional drug susceptibility test and AdvanSure MDR-TB

		AdvanSure MDR-TB					
		RFP			INH		
		R	S	Total	R	S	Total
DST	R	33	6	39	59	15	74
	S	4	499	503	6	462	468
	Total	37	505	542	65	477	542

Abbreviations: RFP, rifampin; INH, isoniazid; DST, the conventional drug susceptibility test; R, resistant; S, susceptible.

Abbreviations: DST, the conventional drug susceptibility test; R, resistant; S, susceptible; r, low level resistance; WT, wild type; -, not tested.

기서열분석에서 *katG* 변이가 발견되었다. 2검체는 AdvanSure MDR-TB 검사의 *katG* S315T (KM) probe가 검출 못한 경우였고, 2검체는 AdvanSure MDR-TB에 변이검출probe에 포함되어 있지 않은 *katG* S315N 변이였다. INH 위내성 6검체는 중 5검체는 염기서열분석과 내성유전자형까지 서로 일치하였다. 그 중 *inhA* C-15T 변이를 보인 검체들은 MGIT도 위내성인 반면 염기서열분석 결과와 치환된 아미노산이 서로 달랐던 *ahpC* 조절유전자 변이를 보인 한 검체는 MGIT 감수성이었다.

2. 결핵균의 RFP와 INH 내성 유전자형 분포

RFP 내성 39검체 중 36검체(92.3%)에서 내성유전자가 검출되었다(Table 3). RFP 내성에서는 *rpoB* S531L 변이가 21검체(53.8%)로 가장 많았고 다음은 *rpoB* D516V 6검체(15.4%), *rpoB* H526R 3검체(7.7%), *rpoB* D516Y 2검체(5.1%)순이었고, *rpoB* Q513L, *rpoB* S522L, *rpoB* L533P 및 코돈 515-518 부위의 복합변이(*rpoB* M515I, D516A, Q517N, N518Y)가 각각 한 검체(2.6%)였다. *rpoB* H526R 변이인 3검체는 AdvanSure MDR-TB RFP 위감수성이어서 염기서열분석 결과가 포함되었다. 염기서열분석에서 코돈 515-518 부위의 복합변이(*rpoB* M515I, D516A, Q517N, N518Y)를 보인 한 검체는 AdvanSure MDR-TB RFP에서는 *rpoB* RW2 (514-520) 소실을 나타내었다. RFP 감수성인 503검체 중 각각 한 검체(각각 0.2%)에서 각각 코돈 516, 520, 26 및 531 부위에 존재하는 변이가 검출되었다. 한편, 환자군별로 보면 *rpoB* D516V 변이를 보인 6검체 중 4검체가 재치료군에서 검출되었으며, *rpoB* H526R 변이는 초치료군에

서만 검출되었다. INH 내성 74검체 중 63검체(85.1%)에서 내성유전자가 검출되었다(Table 4). INH 내성에서는 *katG* S315T 변이가 44검체(58.1%)로 제일 많았고 다음은 *inhA* C-15T 17검체(23.0%), *katG* S315N 3검체(4.1%)순이었다. *katG* S315N 변이 2검체와 *katG* S315T 변이 2검체는 AdvanSure MDR-TB INH 위감수성으로 염기서열분석결과를 이용하였다. 염기서열분석에서 *katG* S315N 변이인 한 검체는 AdvanSure MDR-TB에서는 코돈 315 부위의 야생형 소실을 보였다. 한편, INH 감수성인 468검체 중 6검체(1.3%)에서 *inhA* 혹은 *ahpC* 유전자변이가 검출되었다. 환자군별로 보면 초치료군과 재치료군 간의 내성유전자 빈도는 차이 없었다($P>0.05$).

MDR-TB 33검체 중에서는 *rpoB* S531L과 *katG* S315T가 같이 검출된 경우가 11검체(33.3%)로 가장 많았고 *rpoB* S516V와 *katG* S315T가 같이 검출된 것이 5검체(15.2%)였다. RFP 내성 유전자는 *rpoB* S531L 변이가 16검체(48.5%)로 가장 많았고, *rpoB* D531V 6검체(18.2%), *rpoB* H526R 3검체(9.1%), *rpoB* D531Y 2검체(6.1%)였으며, *rpoB* Q513L, *rpoB* S522L 및 *rpoB* L531L 변이가 각각 한 검체(3.0%)였고 3검체(9.1%)는 아무런 돌연변이가 없었다. INH 내성유전자는 *katG* S315T 변이가 22검체(66.7%)로 제일 많았고 *inhA* 변이 5검체(15.2%), *katG* S315N 변이가 한 검체(3.0%)순이었으며 5검체(15.2%)는 아무런 돌연변이가 없었다.

한편, 재검 기준에 따라 28개의 대상검체(5.2%) 중 가능했던 24검체에서 재검을 시행하였다. 그 중 22검체는 재검에서는 각 약제의 변이형 밴드 세기와 야생형 밴드 세기 비가 0.2 이하 혹은 1.6 이상이거나 야생형 밴드나 변이형 밴드 세기가 2 이상으로 나와 내성 혹은 감수성으로 쉽게 판독할 수 있었다. 나머지 2검체는 재검에서도 야생형 밴드인 *rpoB* RW2 (514-520) 및 *katG* locus 313-319 (KW) 소실을 보였으며 염기서열분석에서는 각각 *rpoB* M515I, D516A, Q517N, N518Y 복합 변이와

Table 3. Frequencies of mutations associated with RFP by Advan-Sure MDR-TB or sequencing

Final results by DST	Genotypes	AdvanSure MDR-TB or sequencing		
		New (%)	Treated (%)	Total (%)
Resistant	Total	21 (100)	18 (100)	39 (100)
	<i>rpoB</i> S531L	11 (52.4)	10 (55.6)	21 (53.8)
	<i>rpoB</i> D516V	2 (9.5)	4 (22.2)	6 (15.4)
	<i>rpoB</i> H526R	3 (14.3)	0	3 (7.7)
	<i>rpoB</i> D516Y	1 (4.8)	1 (5.6)	2 (5.1)
	<i>rpoB</i> Q513L	1 (4.8)	0	1 (2.6)
	<i>rpoB</i> S522L	0	1 (5.6)	1 (2.6)
	<i>rpoB</i> L533P	1 (4.8)	0	1 (2.6)
	<i>rpoB</i> M515I, D516A, Q517N, N518Y	1 (4.8)	0	1 (2.6)
	Wild type	1 (4.8)	2 (11.1)	3 (7.7)
Susceptible	Total	452 (100)	51 (100)	503 (100)
	<i>rpoB</i> D516Y	0	1 (2.0)	1 (0.2)
	<i>rpoB</i> P520L	1 (0.2)	0	1 (0.2)
	<i>rpoB</i> H526N	1 (0.2)	0	1 (0.2)
	<i>rpoB</i> S531L	0	1 (2.0)	1 (0.2)
	Wild type	450 (99.6)	49 (96.1)	499 (99.2)

Abbreviations: DST, the conventional drug susceptibility test; New, newly treated patient; Treated, previously treated patient.

Table 4. Frequencies of mutations associated with INH by Advan-Sure MDR-TB or sequencing

Final results by DST	Genotypes	AdvanSure MDR-TB or sequencing		
		New (%)	Treated (%)	Total (%)
Resistant	Total	49 (100)	25 (100)	74 (100)
	<i>katG</i> S315T	30 (61.2)	13 (52.0)	43 (58.1)
	<i>inhA</i> C-15T	11 (22.4)	6 (24.0)	17 (23.0)
	<i>katG</i> S315N	3 (6.1)	0	3 (4.1)
	Wild type	5 (10.2)	6 (24.0)	11 (14.9)
Susceptible	Total	424 (100)	44 (100)	468 (100)
	<i>inhA</i> C-15T	4 (0.9)	0	4 (0.9)
	<i>ahpC</i> C-10T	1 (0.2)	0	1 (0.2)
	<i>ahpC</i> C-10A	1 (0.2)	0	1 (0.2)
	Wild type	418 (98.6)	44 (100)	462 (98.7)

Abbreviations: DST, the conventional drug susceptibility test; New, newly treated patient; Treated, previously treated patient.

katG S315N 변이를 보였다.

고 찰

본 연구에서 AdvanSure MDR-TB 결과와 절대농도법과의 검사 일치도는 94.3%으로 이전 Han 등[13]이 보고한 95.1%와 동등한 수준이었다. AdvanSure MDR-TB의 내성검출특이도는 RFP 99.2%, INH 98.7%로 기존 보고(RFP 99.2%, INH 99.2%)나 다른 line probe assay 법인 Genotype MTBDRplus (Hain LifeScience, Nehren, German)의 RFP 99.2%, INH 100% 및 염기서열분석의 RFP 100%, INH 96.6%와 동등한 수준이었다. 그러나, AdvanSure MDR-TB의 내성검출민감도는 RFP 84.6%로 이전 보고(94.7%) [13]나 MTBDRplus (91.9-100%) [8,11,13,14] 및 염기서열분석 결과(93.3%) [10]보다 낮았는데, 본 연구에서는 AdvanSure MDR-TB RFP에 변이검출probe가 없는 *rpoB* H526R 변이 3검체를 야생형으로 판정하였기 때문이었다. INH의 내성검출민감도(79.7%)는 내성검출특이도에 비해 낮았으나 이전 보고(80%)나 MTBDRplus (75-82.4%) 및 염기서열분석 결과(82.2%) [10,11,14]와 유사하였다. 이렇듯 분자진단법에서 INH 내성검출민감도가 RFP보다 낮은 이유는 RFP 내성을 유발하는 *rpoB* 유전자의 변이가 대부분 81 bp의 짧은 부위에 몰려 있는 반면[15,16], INH 내성은 *katG*, *inhA* 유전자의 여러 부위에서 변이가 발생할 수 있으며 더불어 *ahpC*, *kasA*, *ndh* 등과 같은 다양한 유전자들의 변이가 INH 내성발현에 관계되어 있기 때문이다[5,7,9,17,18].

AdvanSure MDR-TB 위감수성은 21검체(RFP 위감수성 6검체, INH 위감수성 15검체)로 AdvanSure MDR-TB에서 위감수성인 7검체는 염기서열분석에서도 내성유전자가 검출되었다. RFP 위감수성 3검체는 염기서열분석 결과 *rpoB* H526R 변이였고, INH 위감수성 4검체는 각각 *katG* S315T 변이 2검체, *katG* S315N 변이 2검체였다. *rpoB* H526R 변이는 전체 RFP 내성유전자 중 세 번째 빈도(8.3%)로 국내에서는 아직 보고된 자료가 없으며 중국에서의 빈도(3.0%, 5/168) [14]보다 높았다. *katG* S315N 변이는 전체 INH 내성유전자 중 세 번째 빈도(4.1%)로 기존의 국내 보고(2.8%, 2/71) [18]보다 높았고 중국의 6.5% (11/168)보다는 낮았다[14]. 이 두 변이형은 AdvanSure MDR-TB 뿐만 아니라 국내에서 널리 사용되고 있는 Genotype MTBDRplus이나 REBA MTB-MFR (M&D, 서울, 한국)에서도 이 변이형에 대한 검출probe가 아직 없다[11,14]. *rpoB* 코돈 526 부근의 locus 부위와 *katG* 코돈 315 부근의 locus 부위가 GC rich 영역으로 염기서열 주변의 Tm (melting temperature) 값이 높기 때문에 야생형 띠(RW4; 524-530 코돈 및 KW; 313-319 코돈)가 소실될 정도로 단일 뉴클레오타이드 변이를 검출하는 데에는 한계점이 있었을 것으로 추정된다. 이렇듯 AdvanSure MDR-TB에 변이검출probe가 없으면 야생형 소실

에 대한 검출 민감도가 떨어질 수 있는데, MTBDRplus도 염기서열분석에서 *rpoB* H526R 변이가 있던 5검체 중 한 검체(20%)는 RFP 감수성, *katG* S315N 변이가 있던 11검체 중 10검체(90.1%)를 INH 감수성으로 판독하여 본 연구와 동일한 양상을 보였다[14]. 따라서 각 약제의 고도내성과 관련된 *rpoB* H526R 변이와 *katG* S315N 변이 빈도에 대한 추가 연구와 함께 내성검출probe의 추가 또는 야생형 소실로 인한 내성검출민감도의 향상이 필요할 것으로 생각된다. 한편, *katG* S315T 변이가 검출된 2검체는 AdvanSure MDR-TB INH 검사에 *katG* S315T 변이검출probe가 있었음에도 제대로 검출되지 못한 예였다. *katG* S315T 변이는 코돈 315 AGC (Ser)에서 치환된 아미노산 종류에 따라 유형 I인 ACC (Thr)로 변이된 것(*katG* S315T1)과 유형 II인 ACA (Thr)으로 변이된 것(*katG* S315T2) [7,14]으로 구분된다. 그런데, AdvanSure MDR-TB에서는 *katG* S315T1형을 검출하는 probe만 있어 *katG* S315T2형을 검출하지 못한 것으로 판단하였다. 따라서 앞으로 *katG* S315T 변이검출probe에 *katG* S315T2형 추가를 고려하여 할 것이다. 나머지 위감수성 13검체(RFP 위감수성 3검체, INH 위감수성 10검체)는 염기서열분석에서도 위감수성이었다. 더욱이 INH 경우는 MGIT INH 검사도 모두 내성이었다. 따라서 *rpoB* 유전자의 hot spot 이외 부위의 변이에 의한 내성[10,16]이거나 INH 내성에 관여하는 다른 유전자(*kasA*, *ndh*, *iniA*, *oxyR*, *furA* 등) [6,7,9] 혹은 RFP와 INH 내성에 관여하는 새로운 변이일 가능성도 있다. 그러나 RFP 위감수성 중 한 검체는 MGIT도 위감수성이므로 절대농도법의 RFP 위양성 가능성도 고려해야 할 것이다.

AdvanSure MDR-TB 위내성은 RFP 4검체, INH 6검체로 염기서열분석에서 모두 내성유전자가 검출되었다. 그러나 RFP 위내성 중 *rpoB* D516Y 변이와 *rpoB* S531L 변이를 보인 2검체만 내성유전자형까지 일치하였는데, 그 중 *rpoB* D516Y 변이는 국내 RFP 내성균주의 1.9% 정도인 드문 변이로 실제 RFP 내성을 유발하는지는 아직 밝혀지지 않아 RFP 감수성부터 고도내성까지 매우 다양하게 보고되고 있으며[16], *rpoB* S531L 변이는 RFP 내성과 관련하여 가장 많이 검출되는 변이로 RFP고도내성을 나타낸다[15]. 두 분자진단법 간에 내성유전자형이 서로 달랐던 2검체 중 *rpoB* H526N 변이인 한 검체는 AdvanSure MDR-TB에서는 *rpoB* H526D 및 H526Y 혼합변이였는데, 이 변이형은 국내 RFP 내성의 2.2%에서 관찰되는 RFP 고도내성과 관련된 변이[19]로 AdvanSure MDR-TB에서는 검출probe가 없으며 검사 과정 중 교잡 반응에 대한 간섭 현상에 의해 *rpoB* H526D 및 526Y가 검출된 것으로 추정되었다. 다른 한 검체는 염기서열분석은 *rpoB* P520L 변이이나 AdvanSure MDR-TB에서는 *rpoB* Q513L 변이였다. *rpoB* P520L 변이형은 기존 연구 결과에서는 보고되지 않고 본 연구에서 처음으로 확인된 변이였으며 AdvanSure MDR-TB 검출probe에 포함되지 않는 영역

의 변이로 염기서열분석 결과와 차이를 보인 이유는 본 연구에서는 밝힐 수 없었다. INH 위내성 6검체는 염기서열분석에서는 모두 INH 저도내성과 관련된 *inhA* C-15T 변이 혹은 *ahpC* 조절유전자 변이였으며 특히 *inhA* C-15T 변이인 4검체는 MGIT 검사도 내성이어서 *inhA* C-15T 변이를 보이는 INH 저도내성은 LJ 배지에 의한 절대농도법보다 MGIT에서 더 잘 검출된다고 기존 보고[19]와 일치하였다. *ahpC* 조절유전자 변이도 *kagG* 변이와 동반하지 않고 단독으로 존재시 절대농도법에서 INH 감수성을 보일 수 있다[13,18] 따라서, AdvanSure MDR-TB에서 위내성을 보이는 경우 *rpoB*, *inhA*, *ahpC* 변이 검출probe가 위양성일 가능성 이외에도 절대농도법의 RFP, INH의 임계농도(각각 RFP 40 µg/mL, INH 0.2 µg/mL)이하에서 결핵균이 자라는 정도의 저도내성이거나 혼합감염 또는 동일 클론의 일부가 내성을 획득해서 내성 균주와 감수성 균주가 동시에 존재하는 불균질내성일 가능성을 고려할 수 있다[19,20].

RFP 내성 유전형은 코돈 531, 526, 516 부위의 돌연변이가 가장 흔하게 발견되며[15], 특히 코돈 *rpoB* 531 부위의 변이는 RFP와 rifabutin에 교차내성이 있음이 알려져 있다[19]. 코돈 531 및 526과 *rpoB* D516V 변이는 RFP 고도내성과 관련이 있고, 코돈 511, 대부분의 516, 518, 522 변이는 RFP 저도내성과 관련이 있다[19]. 본 연구에서 RFP 내성균주 중 *rpoB* S531L 변이가 53.8%로 국내 및 국외에서 보고한 *rpoB* S531L 변이빈도(47-73.6%)와 유사하였으며[10,13,14] 대부분(95.2%)에서 rifabutin과 교차내성을 보였다. 하지만, 코돈 516 부위의 변이가 20.5%로 두 번째였으며, 기존 국내 연구[21,22]에서 26-78%를 차지하였던 코돈 526 변이는 7.7%에 불과했다. *rpoB* Q513L, S522L, L533P 변이는 RFP 저도내성과 관련된 변이로 기존 보고(각각 0.8-1.9%)와 유사한 빈도(2.6%)를 보였다[19]. 환자군 별로 보면 *rpoB* D516V 변이는 재치료군의 빈도(22.2%)가 초치료군의 빈도(9.5%)보다 높아($P < 0.05$), 이 변이가 치료와 관련된 RFP 내성 발현에 관여하는지에 대해서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. INH 내성균의 약 53.6-65%는 *katG* 유전자 돌연변이에 의해서 발생하며, 그 중 *katG* S315T 변이가 48.5-88.4%로 가장 빈도가 높으며 지역적으로도 매우 다양하다[10,11,17]. 본 연구에서도 INH 내성의 62.2%가 *katG* 유전자 변이였으며, *katG* S315T 변이는 58.1%로 기존의 국내 보고(55.2-56.3%) [10,11]와 유사하였고 *katG* S315N 변이는 INH 내성의 4.1%를 보여 기존 보고(2.8%, 2/71) [18]보다 높았고 중국의 6.5% (11/168)보다는 낮았다[14]. 그 다음은 *inhA* promotor 변이인데, 이 부위에 변이가 있을 경우 86%에서 INH 유도체인 ethionamide와 교차내성을 보인다[21]. 본 연구에서 INH 내성균의 *inhA* promotor 변이는 모두 *inhA* C-15T 변이로 23%를 차지하여 기존 보고(15.8-31.3%) [13,19]와 유사하였다. 한편, *ahpC* 조절유전자 변이는 단독으로 존재하는 경우 INH 감수성부터 저도내성까지 다양하게 관찰된다[21]. 본 연구에서는 그

빈도가 3% (2/69)로 기존 국내 보고인 5.6-19% [13,17]보다 낮았으며 모두 INH 감수성이었다.

MDR-TB의 RFP 내성유전자는 *rpoB* S531L 변이가 48.5% (11/33)로 가장 많아 염기서열분석을 이용한 연구 결과(55.0%, 82/149) [10]와 유사하였다. INH 내성유전자는 *katG* S315T 변이가 66.7% (22/33)로 가장 많았고, *inhA* C-15T 변이가 15.2% (5/33)를 보여 2007년 국내 MDR-TB 29주를 대상으로 한 연구 결과인 *katG* S315T 변이 55.2% (16/29), *inhA* C-15T 변이 24.1% (7/29) [20]와 유사하였다. 최근 *inhA*-15/-8와 *katG* 변이가 함께 있는 변이형은 MDR-TB에서만 발견된다고 보고된 바 있지만[13], 본 연구의 MDR-TB 균주 중에서는 *katG*와 *inhA* 변이가 공존하는 경우는 없었다. 한편, 본 연구에서 AdvanSure MDR-TB 결과와 염기서열분석 결과와의 비교는 절대농도법과 불일치하였거나 AdvanSure MDR-TB에서 야생형 소실이 있는 32검체만을 대상으로 하였으므로 그 개수가 적어 AdvanSure MDR-TB 결과만으로 내성유전형을 평가하는 데 한계점이 있다. 따라서 추후 염기서열분석과의 비교를 통한 내성유전자 빈도에 대한 전국적인 단위의 광범위한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

AdvanSure MDR-TB는 내성판단 기준으로 RFP 및 INH의 변이형과 야생형 밴드의 세기 비를 1.00로 정하고 있다. Han 등 [13]이 144검체의 AdvanSure MDR-TB 결과의 각 밴드세기를 분석한 연구에서 억제감수성균주는 각 변이형과 야생형 밴드의 세기 비가 0.1-0.4 사이에 분포하고, 내성균주는 최저 1.62 이상을 보이므로 *ahpC* 변이형을 보인 한 검체를 제외하고는 애매한 수치에 의해 판정하기 어려운 경우가 없다고 보고하였다. 본 연구에서도 재검을 시행한 24검체 중 2검체만 이전 검사와 동일하게 야생형 소실을 보였고 염기서열분석에서 내성유전자가 검출되었다. 따라서 애매한 수치를 보일 경우 재검을 하면 야생형 소실과 교잡 반응시의 부적절한 반응 등에 따른 검사 과정의 오류 [13]를 구별할 수 있을 것으로 생각되었다.

결론적으로 AdvanSure MDR-TB는 기존의 절대농도법과 비교하여 RFP 및 INH 내성에 대해 높은 검사일치도를 보였으며, INH 내성 검출탐색자로 *inhA* 유전자와 *ahpC* 유전자를 같이 포함하고 있어 INH 저도내성 결핵의 검출에 기여할 것으로 생각된다. 그러나, 변이가 일어난 부위를 직접 검출할 수 있는 내성 검출탐색자가 없을 경우, 야생형 소실로 인한 내성 검출이 안 되는 경우가 있으므로, 내성 검출탐색자의 추가 또는 야생형 소실을 통한 내성 검출의 보완이 필요하며, 추후 내성유전자의 빈도에 대한 광범위하고, 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 임상미생물학회-LG 생명과학연(주)의 연구비 지원을 받아 수행되었음.

참 고 문 헌

- Kim BJ, Lee IH, Lee DH, Bai GH, Kong SJ, Lee SH, et al. The current status of multidrug-resistant tuberculosis in Korea. *Tuberc Respir Dis* 2006;60:404-11.
- Korea Centers for Disease Control and Prevention. Annual report on the notified tuberculosis patients in Korea 2009. Seoul; Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2010.
- World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug resistant tuberculosis: Emergency update 2008. Geneva, Switzerland; World Health Organization, 2008.
- Joint Committee for the Development of Korean Guidelines for Tuberculosis. Korean guidelines for tuberculosis. 1st ed. Chungbuk; Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2011:32-3.
- Ahmad S and Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respir Med* 2009;103:1777-90.
- Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 2005;43:5477-82.
- Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *aphC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu Natal, South Africa. *Tuberc Lung Dis* 2000;80:47-56.
- Akpaka PE, Baboolal S, Clarke D, Francis L, Rastogi N. Evaluation of methods for rapid detection of resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in the Caribbean. *J Clin Microbiol* 2008;46:3426-8.
- Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6:423-32.
- Cho EH, Bae HK, Kang SK, Lee EH. Detection of isoniazid and rifampicin resistance by sequencing of *katG*, *inhA*, and *rpoB* genes in Korea. *Korean J Lab Med* 2009;29:455-60.
- Jeong TD, An D, Sung H, Chi HS, Kim MN, Shim TS. Evaluation of the performance of GenoType[®] MTBDRplus assay for rapid detection of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. *Lab Med Online* 2011;1:19-25.
- Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* 2001;344:1294-303.
- Han SB, Jo Y, Yu JK, Kim Y, Park YJ. Performance assessment of AdvanSure[™] MDR-TB genoblot assay kit for anti-tuberculosis drug susceptibility test. *Lab Med Online* 2012;2:34-40.
- Jin J, Zhang Y, Fan X, Diao N, Shao L, Wang F, et al. Evaluation of the GenoType[®] MTBDRplus assay and identification of a rare mutation for improving MDR-TB detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:521-6.
- 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.
- Zaczek A, Brzostek A, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Dziadek J. Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin. *BMC Microbiol* 2009;9:10.
- Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2640-9.
- Kim SY, Park YJ, Kim WI, Lee SH, Ludgerus Chang C, Kang SJ, et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:497-502.
- Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Kawabe Y, Takashima T, et al. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. *J Clin Microbiol* 2008;46:2263-8.
- Rinder H, Mieskes KT, Löscher T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:339-45.
- Kim BJ, Oh SH, Cho EJ, Park SK. Cross-resistance between rifampicin and rifabutin and its relationship with *rpoB* gene mutations in clinically isolated MDR-TB strains. *Tuberc Respir Dis* 2006;60:171-9.
- Lin HH, Kim HY, Yun YJ, Park CG, Kim BJ, Park YG, et al. Mutations of *katG* and *inhA* in MDR *M. tuberculosis*. *Tuberc Respir Dis* 2007;63:128-38.

=국문초록=

호흡기검체에서 분리된 결핵균을 이용한 AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay 리팜핀 및 이소니아지드 내성 검출능 평가

¹가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실, ²성균관대학교 삼성서울병원 진단검사의학과, ³양산부산대학교병원 진단검사의학과, ⁴이화여자대학교 목동병원 진단검사의학과, ⁵전남대학교병원 진단검사의학과

김자영¹, 박연준¹, 이남용², 장철훈³, 이미애⁴, 신중희⁵

배경: 본 연구에서는 국내에서 개발된 AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay kit (이하 AdvanSure MDR-TB, LG 생명과학, 한국)를 이용하여 전국의 호흡기 검체에서 검출된 결핵균에서 리팜핀(rifampin, RFP) 및 이소니아지드(isoniazid, INH) 내성결핵 검출능을 평가하였다.

방법: 2010년 2-7월 동안 전국에 분포한 국내 6개 대학병원의 총 542명 환자의 호흡기 검체에서 분리된 결핵균을 대상으로 하여 AdvanSure MDR-TB 검사를 시행하고 이를 절대농도법 결과와 비교하였다.

결과: 절대농도법과 비교하여 AdvanSure MDR-TB 검사의 검사일치도, 내성 검출의 예민도 및 특이도는 RFP 검사에서는 각각 98.2% (532/542), 84.6% (33/39), 및 99.2% (499/503)였으며, INH 검사에서는 각각 96.1% (521/542), 79.7% (59/74), 98.7% (462/468)였다. RFP 내성결핵에서 가장 빈도가 높았던 세 가지 변이형은 *rpoB* S531L 변이(53.8%), *rpoB* D516V 변이(15.4%), *rpoB* H526R 변이(7.7%)였다. INH 내성 결핵에서는 *katG* S315T 변이 빈도가 가장 높았고(58.1%), 다음은 *inhA* C-15T (23.0%), *katG* S315N (4.1%)순이었다.

결론: AdvanSure MDR-TB는 절대농도법과 비교하여 RFP 및 INH 내성 결핵 검출에 대해 높은 검사일치도를 보여 RFP와 INH 내성 결핵의 조기검출에 유용한 검사법이나 민감도의 보완이 필요할 것으로 생각된다. [대한임상미생물학회지 2012;15:117-124]

교신저자 : 박연준, 137-701, 서울시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과
Tel: 02-2258-1640, Fax: 02-2258-1719
E-mail: yjpk@catholic.ac.kr