원저
Lab Med Online
Vol. 1, No. 1: 19-25, January 2011
DOI 10.3343/lmo.2011.1.1.4

임상미생물학 LMO

객담 검체에서 다제내성 결핵균의 검출을 위한 GenoType® MTBDR*plus*의 평가

Evaluation of the Performance of GenoType® MTBDR*plus* Assay for Rapid Detection of Multi-drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Specimens

정태동[1] · 안동희[1] · 성흥섭[1] · 지현숙[1] · 김미나[1] · 심태선[2]
Tae Dong Jeong[1], Dongheui An[1], Heungsup Sung[1], Hyun Sook Chi[1], Mi-Na Kim[1], Tae Sun Shim[2]

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과[1], 호흡기내과[2]
Departments of Laboratory Medicine[1] and Internal Medicine[2], University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background: GenoType® MTBDR*plus* assay (Hain Lifescience, Germany) enables detection of the mutations prevalent in *rpoB, katG*, and *inhA* genes and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB). We evaluated the performance of the MTBDR*plus* assay in detecting multi-drug resistant *M. tuberculosis* in sputum specimens by directly comparing it to the performance of conventional drug susceptibility testing (DST) with *M. tuberculosis* culture isolates.
Methods: From December 2007 to July 2008, 40 patients with acid-fast bacilli (AFB) smear-positive and AFB culture-positive sputa, including 19 patients with rifampin (RIF)- or isoniazid (INH)-resistant MTB isolates, were enrolled. The MTBDR*plus* assay was performed using DNA extracted from respiratory specimens. DST of the culture isolates was performed using an absolute concentration method.
Results: The result of the AFB smear test was ±1 for 7 specimens, +1 for 8 specimens, +2 for 9 specimens, +3 for 9 specimens, and +4 for 7 specimens. The MTBDR*plus* assay revealed that 37 of the 40 specimens were positive for an MTB-specific band, 12 specimens were RIF-resistant, and 16 specimens were INH-resistant. The *rpoB* S531L mutation was detected in 58.3% of the RIF-resistant specimens, and the *katG* S315T1 and *inhA* C15T mutations were detected in 56.3% and 31.3% of the INH-resistant specimens, respectively. Compared to the sensitivity and specificity of DST, both sensitivity and specificity of MTBDR*plus* assay for RIF resistance were 100%, and the corresponding values for INH resistance were 82.4% and 90.0%. Discrepant MTBDR*plus* assay and DST results were obtained in 3 INH-resistant isolates without mutation and 2 INH-susceptible isolates with *katG* S315T1 and *inhA* C15T mutations.
Conclusions: The MTBDR*plus* assay can be applied for AFB smear-positive specimens with positivity ± to 4+. The assay was reliable for predicting the RIF resistance of culture isolates, but DST was required for confirming INH resistance.

Key Words: GenoType® MTBDR*plus* assay, Rifampin, Isoniazid, Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*

서 론

국내 결핵은 2001년 이후 매년 30,000-36,000명의 신환이 지속적으로 발생하였고, 2009년에는 35,845명으로 신환발병률이 인구 10만 명당 73.5명이며 70대 이상(21.0%)과 20대(16.0%)의 발병률이 높은 후진국형 감염양상을 보이고 있다[1]. 일차 결핵약제 치료를 할 수 없는 항결핵제 내성, rifampin (RIF)과 isoniazid (INH)에 내성인 다제내성 결핵(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)[2], 주사제 중 하나 이상 그리고 fluoroquinolone제 중 하나 이상에 내성인 광범위내성 결핵(extensively drug-resistant TB) [3]에서 더 나아가 모든 항결핵약제에 내성을 보이는 결핵(totally drug-resistant TB) [4]까지 보고되고 있어서 결핵의 치료와 관리에 큰 걸림돌이 된다. 국제보건기구(World Health Organization, WHO)의 2002년에서 2007년 사이 83개국의 항결핵약제 내성률 조사에서 2004년

Corresponding author: Mi-Na Kim
Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center and University of Ulsan College of Medicine, 388-1 Pungnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea
Tel: +82-2-3010-4511, Fax: +82-2-478-0884
E-mail: mnkim@amc.seoul.kr

Received: August 9, 2010
Revision received: September 11, 2010
Accepted: September 13, 2010

This article is available from http://www.labmedonline.org
© 2011, Laboratory Medicine Online
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.

도 한국의 결핵 초치료 환자의 다제내성률은 2.7%였고, 재치료 환자의 14.0%가 다제내성 결핵이었다. 초치료 환자의 다제내성률은 중국, 인도, 베트남 등과 유사했고, 일본의 0.7% 보다 높았다[5].

다제내성 결핵이 증가함에 따라 미국은 초치료 환자에서 약제내성검사를 시행하도록 하고 있고[6], 최근 국내에서도 2005년 개정된 대한결핵 및 호흡기학회의 지침에 따르면 과거 치료력에 상관없이 배양 양성 환자에서는 분리된 첫 결핵균에 대하여 약제내성검사를 시행할 것을 권고하고 있다[7]. 항결핵제 내성균에 의한 감염을 빨리 진단하기 위해 미국 질병관리본부에서는 항결핵제에 대한 내성검사를 검체 채취로부터 1개월 이내에 보고하는 것을 권장하고 있으나[8], 국내 검사기관들은 고체배지에 의존해서 내성검사를 하므로 약제내성검사의 검사소요시간이 28-60일 정도로 걸려 결과보고까지 시간이 적절하지 못하다[9].

최근 항결핵제내성을 신속하게 검사할 수 있는 방법으로 액체배지 감수성 검사, DNA line probe assay, nitrate reductase assay, microscopic observation drug susceptibility assay, bacteriophage-based assay 등이 있다[10]. 국내에 최근 소개된 GenoType MTBDR*plus* (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)는 DNA line probe assay의 일종으로 AFB 도말 양성검체와 배양검체로부터 결핵균 동정과 리팜핀, INH 내성을 동시에 진단하는 방법이다[11]. 이전 버전인 GenoType MTBDR에서 검출목표로 했던 *rpoB*와 *katG* 변이 이외에 *rpoB* 정상형 유전자 522-533 코돈변이와 *inhA* 촉진체 부위의 변이까지 검출할 수 있도록 고안된 방법이다[11, 12]. 이처럼 직접검체에서 약제내성 결핵균을 검출하면 결핵치료 초기에 내성여부에 따라 항결핵제를 선택할 수 있어서 환자 치료에 크게 도움이 될 뿐 아니라 다제내성 결핵의 전파를 방지하는 효과도 있다[11].

이 연구는 직접검체에 MTBDR*plus* 검사를 적용했을 때 수행능을 평가하기 위해 항산균 도말검사 양성인 호흡기검체에 직접 MTBDR*plus* 검사를 실시한 결과와 그 검체에서 배양된 균주의 약제내성검사 결과를 비교하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2007년 12월부터 2008년 7월까지 서울아산병원 검사실에 의뢰된 객담검체 중 항산균 도말 양성으로 결핵균이 배양되어 약제내성검사를 실시하였던 37검체와 비결핵항산균이 배양된 3검체 등 40검체를 대상으로 하였다. 배양분리된 결핵균 중 19주는 RIF 또는 INH에 내성이었다.

2. 항산균 도말 염색 및 약제내성검사

항산균 도말은 auramine-rhodamine 형광염색을 하여 미국 질병관리본부 기준에 의해 판독하였고[13], 의양성(±) 이상의 다양한 강도의 양성검체를 대상으로 하였다. 약제내성검사는 결핵연구원에서 Lowenstein-Jensen 고형배지를 이용한 절대농도법으로 시행하였다. RIF은 40 μg/mL, INH는 0.2 μg/mL 농도에서 자라면 내성으로 하였다. 연구대상 환자의 약제내성검사를 추적관찰 도중에 INH 내성검사가 변경되어 0.2 μg/mL, 1.0 μg/mL 두 가지 농도에서 검사하여 저도내성과 고도내성을 구별하였다.

3. GenoType MTBDR*plus* 검사

항산균 배양을 위해 5% NaOH-*N*-acetyl-L-cystein (NALC) 용액을 이용하여 액화-탈오염-중화-집균을 거친 검체로부터 QIAamp DNA Mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA로 다중 중합연쇄반응 후 증폭산물을 MTBDR*plus* 스트립에 역교잡시켰다. 스트립에는 정확한 시험의 수행과 시약의 효능을 관리하기 위한 결합 대조군, 증폭 대조군, 교잡 대조군 *rpoB, katG, inhA* 등의 유전자좌 대조군 띠 등 5개의 대조군 띠가 있다. 결핵균 여부를 판정하는 1개의 띠(TUB), 8개의 *rpoB* 정상형 띠(*rpoB* WT1-WT8, 505-533 codon), 4개의 *rpoB* 변이형 띠(*rpoB* MUT1, D516V; *rpoB* MUT2A, H526Y; *rpoB* MUT2B, H526D; *rpoB* MUT3, S531L), 1개의 *katG* 정상형 띠(*katG* WT, 315 codon), 2개의 *katG* 변이형 띠(*katG* MUT1, S315T1; *katG* MUT2, S315T2), 2개의 *inhA* 정상형 띠(*inhA* WT1, -15 and -16; *inhA* WT2, -8), 4개의 *inhA* 변이형 띠(*inhA* MUT1, C15T; *inhA* MUT2, A16G; *inhA* MUT3A, T8C; *inhA* MUT3B, T8A) 등 총 27개의 띠로 구성되어 있다. 결과판독은 결핵균 특이 띠가 보이면 결핵균 종 동정을 확인하고, *rpoB*, *katG*, *inhA*의 정상형 띠가 보이지 않거나 변이형 띠가 관찰되면 돌연변이가 있는 것으로 판단하였다.

4. GenoType MTBDR*plus* 결과와 배양분리주의 약제내성 결과가 불일치할 때 추가적인 검사 및 조사

MTBDR*plus* 결과가 약제내성검사와 불일치하는 검체는 DNA line probe assay를 이용한 다른 회사 제품인 REBA MTB-MDR (M&D, Korea)로 재검하였고, 검체에서 배양분리된 균으로 MTBDR*plus* 검사를 실시했다. 또한 환자의 의무기록을 검토하였으며 약제내성검사를 추적 관찰하였다.

결 과

1. 대상검체의 항산균 도말 결과와 배양결과

40검체의 항산균 도말 결과 ±는 7개, 1+는 8개, 2+는 9개, 3+는 9개, 4+는 7개였다. MTBDR*plus*에서 결핵균 특이 띠는 37검체에서 관찰되었고, 이들 모두 결핵균이 배양되었다. 결핵균 특이 띠가 음

DOI 10.3343/lmo.2011.1.1.4

성인 3검체는 4+, 1+, 2+의 항산균 도말 양성결과를 보였고 각각 *M. avium, M. celatum, M. intracellulare*가 분리되었다.

2. GenoType MTBDR*plus*에서 유전자형

18검체는 *rpoB*, *katG*, *inhA* 모두 정상형 유전자형만 관찰되어 RIF, INH 감수성으로 판독하였다. MTBDR*plus*에서 RIF 내성은 *rpoB* WT3 소실 2검체, *rpoB* WT7 소실 2검체, *rpoB* H526Y 변이 1검체, *rpoB* S531L 변이 6검체, *rpoB* H526Y 변이와 *rpoB* S531L 변이가 함께 관찰된 1검체 등 12검체였다. RIF 내성 원인인 *rpoB* 변이는 *rpoB* S531L가 58.3%, *rpoB* H526Y가 16.7%에서 발견되어 *rpoB* S531L 변이 빈도가 가장 높았다. INH 내성은 *inhA* WT1 소실 1검체, *inhA* WT2 소실 1검체, *katG* S315T1 변이 8검체, *inhA* C15T 변이 5검체, *katG* S315T1과 *inhA* C15T 모두 변이인 1검체 등 총 16검체로 *katG* 변이가 9검체(56.3%), *inhA* 변이는 8검체(50%)에서 관찰되었다. INH 내성의 원인인 변이형은 *katG* S315T1 56.3%, *inhA* 촉진체 C15T 31.3%순으로 *katG* S315T1 변이 빈도가 가장 높았다(Table 1).

3. GenoType MTBDR*plus*와 약제내성검사의 비교

결핵균 특이 띠가 검출된 37검체 중 MTBDR*plus*에서 RIF 감수성/INH 감수성(RIF^S/INH^S)이 분리된 18검체가 정상형이었다. RIF 감수성/INH 내성(RIF^S/INH^R)이 분리된 검체는 *inhA* C15T 변이 3검체, *katG* S315T1 변이 2검체, *inhA* 정상형 유전자 소실 1검체 등 6검체였다. RIF 내성/INH 내성(RIF^R/INH^R)이 분리된 검체는 *katG* S315T1 변이 5검체, *inhA* C15T 변이 1검체, *katG* S315T1 변이와 *inhA* T8C 변이가 함께 관찰된 1검체, *inhA* 정상형 유전자 소실 1검체 등 8검체였다. MTBDR*plus* 결과는 약제내성검사와 비교해서 86.5%가 일치하였다(Table 2).

MTBDR*plus* 검사의 RIF에 대한 민감도와 특이도는 모두 100%였고, INH에 대해서 민감도 82.4%, 특이도 90%, 양성예측도 87.5%, 음성예측도 85.7%였다(Table 3). MTBDR*plus* 결과와 약제내성결과가 일치하지 않은 경우는 5검체로 제9, 10, 11번 등 3검체는 MTBDR*plus* 검사에서 INH 감수성인데 약제내성결과 INH 내성이었다. *katG* S315T1 변이가 관찰된 제18번 검체와, *inhA* C15T 변이가 관찰된 제19번 검체는 약제내성결과에서 INH 감수성이었다.

4. GenoType MTBDR*plus*와 약제내성검사의 불일치 결과

임상검체로 실시한 INH MTBDR*plus* 결과와 약제내성결과가 일치하지 않았던 5검체는 검체에서 배양된 균주로 MTBDR*plus* 검사를 다시 실시하였다. 이 중 4균주는 임상검체로 실시한 이전 결과와 동일하였고, *katG* S315T1 변이를 보였던 제18번 검체에서 분리되었던 균주는 *inhA* C15T 돌연변이를 보였다.

Table 1. Results of the GenoType MTBDR*plus* assay of the specimens showing any resistant genotypes and conventional drug sensitivity testing of their isolates

Specimen No.	AFB smear	GenoType MTBDR*plus*		DST	
		RIF	INH	RIF	INH
1	±	R, loss of *rpoB* WT7	R, *katG* MUT1	R	R
2	2+	R, *rpoB* MUT3	R, *katG* MUT1 and *inhA* MUT3A	R	R
3	±	R, *rpoB* MUT3	R, *katG* MUT1	R	R
4	1+	R, *rpoB* MUT3	R, *katG* MUT1	R	R
5	3+	R, loss of *rpoB* WT3	R, *katG* MUT1	R	R
6	4+	R, loss of *rpoB* WT3	R, *inhA* MUT1	R	R
7	4+	R, *rpoB* MUT2A and *rpoB* MUT3	R, *katG* MUT1	R	R
8	3+	R, *rpoB* MUT3	R, loss of *inhA* WT2	R	R
9	2+	R, *rpoB* MUT3	S	R	R
10	2+	R, *rpoB* MUT3	S	R	R
11	3+	R, loss of *rpoB* WT7	S	R	R
12	±	S	R, *inhA* MUT1	S	R
13	1+	S	R, *inhA* MUT1	S	R
14	±	S	R, *inhA* MUT1	S	R
15	4+	S	R, *katG* MUT1	S	R
16	2+	S	R, *katG* MUT1	S	R
17	±	S	R, loss of *inhA* WT1	S	R
18	1+	R, *rpoB* MUT2A	R, *katG* MUT1	R	S
19	1+	S	R, *inhA* MUT1	S	S

Abbreviations: AFB, acid-fast bacilli; RIF, rifampin; INH, isoniazid; DST, drug susceptibility testing; MUT, mutation; WT, wild type; S, sensitive; R, resistance; *rpoB* WT3, 513-516 codon; *rpoB* WT7 526-529 codon; *rpoB* MUT2A, H526Y; *rpoB* MUT3, S531L; *katG* MUT1, S315T1; *inhA* WT1, -15 and -16; *inhA* WT2, -8; *inhA* MUT1, C15T; *inhA* MUT3A, T8C.

Table 2. Comparison of the GenoType MTBDR*plus* assay and conventional drug susceptibility test results of their isolates in 37 specimens

Phenotypic resistance	No. of isolates	GenoType MTBDR*plus*				
		RFP^S/INH^S	RFP^S/INH^R	RFP^R/INH^S	RFP^R/INH^R	Total
RFP^S/INH^S	19	18	1	0	0	19
RFP^S/INH^R	6	0	6	0	0	6
RFP^R/INH^S	1	0	0	0	1	1
RFP^R/INH^R	11	0	0	3	8	11
Total	37	18	7	3	9	37

Abbreviations: INH, isoniazid; RIF, rifampin; S, sensitive; R, resistance.

Table 3. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the GenoType MTBDR*plus* assay

	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive value	Negative predictive value
RIF^R	100.0% (0.76-1.00)*	100.0% (0.87-1.00)*	100.0%	100.0%
INH^R	82.4% (0.59-0.94)*	90.0% (0.70-0.97)*	87.5% (0.77-0.98)*	85.7% (0.74-0.97)*
MDR-TB	72.7% (0.43-0.90)*	96.2% (0.81-0.99)*	88.9% (0.79-0.99)*	89.3% (0.79-0.99)*

*CI, 95% confidential interval.
Abbreviations: INH^R, isoniazid resistance; RIF^R, rifampin resistance; MDR-TB, multi-drug resistance tuberculosis showing RIF^R and INH^R.

Table 4. Confirmatory susceptibility testing results and previous anti-tuberculosis medication of the 5 patients showing discrepant results between GenoType MTBDR*plus* and conventional drug susceptibility test of the culture isolates

Specimen No.	REBA MTB-MDR		GenoType MTBDR*plus**		DST* Initial/Follow up		Previous Anti-TB medication
	RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH	
9	S	S	R, *rpoB* S531L	S	R/R	R/low-R†	Yes
10	R, *rpoB* S531L	S	R, *rpoB* S531L	S	R/R	R/low-R†	Yes
11	NT	NT	R, loss of 526-529 codon	S	R/R	R/high-R†	Yes
18	S	R, *katG* S315T1	R, *rpoB* H526Y	R, *inhA* C15T	R/R	S/S	No
19	S	R, *inhA* C15T	S	R, *inhA* C15T	S/NT	S/NT	No

*These tests were performed with *Mycobacterium tuberculosis* culture isolates; †low-R, resistant to INH at 0.2 μg/mL but susceptible to INH at 1.0 μg/mL; †high-R, resistant to INH at 1.0 μg/mL.
Abbreviations: TB, tuberculosis; DST, drug sensitivity test; INH, isoniazid; RIF, rifampin; S, sensitive; R, resistance; WT, wild type; NT, not tested.

MTBDR*plus* 결과와 약제 감수성 검사 결과가 일치하지 않은 5검체 중 검사가 가능했던 4검체로 REBA MTB-MDR (M&D, Korea) 검사를 하였다. 제9번, 10번 검체는 REBA MTB-MDR에서 모두 INH 감수성이었고 *katG*, *inhA* 변이를 보였던 제18번, 19번 검체는 REBA MTB-MDR에서 각각 *katG*, *inhA* 변이가 나타나 MTBDR*plus*와 REBA MTB-MDR의 INH 유전자형이 모두 일치하였다. *rpoB* S531L 변이를 보인 제10번 검체와 RIF 감수성인 제19번 검체는 REBA MTB-MDR에서도 동일한 결과를 보였지만, 제9, 18번 검체에서는 RIF 내성 유전형을 검출하지 못했다(Table 4).

제9번, 10번, 11번 검체에 해당하는 환자들은 모두 재치료 환자로 연구기간 이후 배양된 균주의 내성검사 결과도 이 연구에 사용된 균주의 내성검사와 동일하게 INH 내성을 보였다. 추적 검사에서 제9, 10번 검체는 INH 0.2 μg/mL에서 내성 1.0 μg/mL에서 감수성으로 저도내성이었고, 제11번 검체는 INH 1.0 μg/mL에서 내성인 고도내성이었다. 제18번 검체의 환자는 초치료 환자로 표준요법으로 6개월간 치료를 받았으나 지속적인 배양 양성 결핵이었다. 약제내성검사에서 RIF 내성으로 표준요법으로 치료한 지 4개월째 cycloserine, prothionamide를 추가했고 6개월째 RIF을 제외한 약제로 4개월을 더 치료한 후 완치되어 현재 22개월간 재발이 없었다. 이 연구에 포함된 검체는 투약 1개월째 채취하였으며, 이때 분리된 균주로 약제내성검사를 실시한 결과는 RIF 단독 내성이었다. 투약 4개월째 배양에서 분리된 균주도 약제내성검사에서 RIF 단독 내성만을 보였다. 제19번 검체의 환자는 초치료 환자로 MTBDR*plus*와 REBA MTB-MDR에서 모두 *inhA* C15T 변이를 보였으나 표준요법으로 6개월 치료 후 완치되어 현재 20개월간 재발이 없었다.

고 찰

MTBDR*plus*에서 *rpoB* 변이의 빈도는 *rpoB* S531L가 58.3%로 가장 높았고, INH 내성의 원인인 변이형은 *katG* S315T1 56.3%, *inhA* 촉진체 C15T 31.3% 순이었다. MTBDR*plus*로 평가한 국외의 다른 연구[11, 14-19]들에서도 RIF 내성은 *rpoB* S531L 변이가 47-73.6%,

DOI 10.3343/lmo.2011.1.1.4

INH 내성은 *katG* S315T1 변이가 48.5-88.4%로 가장 빈도가 높았고, *inhA* C15T 변이는 0%인 지역에서 40%가 넘는 지역까지 다양했다. 2007년 국내 다제내성 결핵균 29주의 *katG*와 *inhA* 유전자 염기서열을 분석한 연구[20]에서 *katG* 변이가 93.1%, *inhA* 촉진체 C15T 변이가 24.0%, *inhA* 해독틀(open reading frame) 변이가 3.4%에서 발견되었는데, 이 중 *katG* S315T1 변이는 55.2%로 이 연구와 유사하였다. 이전 연구[20]에서 *katG* 변이의 빈도가 높은 이유는 *katG* S315T1 이외의 *katG* 변이를 보인 균주가 8주(27.6%)가 있었기 때문이다. 따라서 이전 연구[20]와 비교했을 때, 이 연구에서 MTBDR*plus*로 검출하지 못한 *katG* 변이가 더 있을 가능성이 있다. 이 연구에서 *inhA* 변이는 INH 내성 검체의 50%에서 발견되어 이전의 국내 보고보다 높았는데 이 보고에서도 INH 내성을 일으키는 *inhA* 변이의 대부분이 *inhA* 촉진체 부위의 C15T 변이였기 때문에[20] *inhA* C15T 변이 부위를 포함한 MTBDR*plus*는 *inhA* 변이 검체를 검출하는데 민감도가 높았을 것으로 생각된다. 이 연구에서 *katG*와 *inhA* 변이가 함께 발견된 검체는 1개에 불과하였고 이때 동반된 변이는 *katG* S315T1과 *inhA* T8C로서 *katG* S315T1과 *inhA* C15T가 공존하는 경우는 없었다. 이는 이전 보고[20]와 일치하며 이 연구에서, INH 내성 7검체가 *inhA* 단독 변이만 발견되어 *inhA* 촉진체 부위 변이를 검출할 수 있도록 고안된 MTBDR*plus*를 사용함으로써 INH 내성 검출 민감도를 높이는데 크게 기여한 것으로 판단하였다.

이 연구에서 MTBDR*plus*는 항산균 도말이 ±인 검체부터 4+인 검체까지 적용하여 우수한 민감도와 특이도를 보였다. 이전 연구에서도 국제보건기구 기준 항산균 도말 양성 강도가 1+ 이상인 경우 MTBDR*plus* 검사는 100% 성공률을 보였다[21]. 이 연구에서 ±인 검체도 100% 판독이 가능했는데 이는 배양에서 결핵균이 배양되었던 검체들만 포함되었기 때문일 것이다. 이전 연구에서도 항산균 도말 음성, 배양 양성인 검체에서도 80%에서 판독이 가능했다고 하여[21] 항산균 도말 검사에서 미국 질병관리본부 양성 판독기준의 ± 강도를 보인 검체일지라도 임상적으로 결핵이 강력히 의심되는 환자라면 MTBDR*plus*로 직접 다제내성 결핵을 감별하는 것이 가능할 것으로 생각하였다. 이 연구에서 특히 RIF 내성을 예측하는데 MTBDR*plus*가 100% 민감도와 특이도를 보였다. MTBDR*plus*를 평가한 이전 연구들도 RIF 내성에 대한 민감도를 91.7-100%로 보고하고 있어서[11, 16-19, 22, 23], MTBDR*plus* 검사와 RIF의 약제내성검사의 일치율이 매우 높다. 그 이유는 RIF 내성을 유발하는 *rpoB* 유전자의 변이가 대부분 81-bp의 짧은 부위에 몰려 있기 때문이다[24]. 하지만, 이 연구의 결과만으로 MTBDR*plus*에서 RIF 내성 예측의 민감도와 특이도가 100%라고 결론을 내리기에는 검체 수가 적은 것이 제한점이다.

INH MTBDR*plus* 민감도는 82.4%로 이전 보고에서 73.0-97.4% 정도로 보고된 것과 유사하다[11, 16-19, 22, 23, 25]. 하지만 캐리비안 지역에서 실시한 연구에서는 34.6%로 훨씬 낮아서 지역에 따라 상당한 차이를 보인다[14]. INH 내성검출 민감도가 RIF보다 낮고 지역에 따라 다양한 이유는 *rpoB* 변이가 짧은 부위에 몰려있는 반면 INH 내성은 *katG*, *inhA* 유전자의 다양한 부위에서 변이가 있을 뿐 아니라[20], 이외에도 *kasA*, *oxyR-ahpC* 등의 유전자 변이에 의해 발생하기 때문이다[26, 27]. 또한 *katG* 유전자 변이는 주로 고농도 INH 내성과 관련이 있고 *inhA* 유전자 변이는 저농도 내성을 일으킨다[26, 28]. 따라서 대상군의 INH 내성 유전자형 분포에 따라 INH 내성에 대한 MTBDR*plus* 검사 민감도가 차이가 날 수 있을 것이다.

이 연구에서 MTBDR*plus* 결과와 INH 약제내성결과가 일치하지 않았던 5검체 중 4검체를 REBA MTB-MDR로 재검했을 때 모두 일치하는 결과를 보여 MTBDR*plus* 결과의 신뢰성을 높여준다. 따라서 MTBDR*plus* 검사에서 INH 감수성인데 분리 균주의 약제 감수성 검사에서 INH 내성이었던 3검체는 MTBDR*plus*에서 검출할 수 없는 변이에 의한 약제내성일 가능성이 있다. 3검체의 환자들은 모두 결핵 과거력이 있는 재치료 환자로 다제내성 결핵을 진단받은 환자였고, 치료 후 분리되었던 균주로 약제내성검사를 다시 실시했을 때 여전히 INH 내성이었던 것은 이를 뒷받침한다. 또한 이들 3검체는 MTBDR*plus* RIF 내성이었고, 이 3검체 외에는 MTBDR*plus* RIF 내성이면 모두 INH 내성이었다. RIF 내성일 때 INH가 감수성일 경우는 드물기 때문에[19, 22, 29] MTBDR*plus* 검사에서 RIF 내성이고 INH 감수성인 유전형을 보인다면 RIF 단독 내성뿐 아니라 INH 결과의 위음성 가능성을 고려해야 할 것이다.

나머지 불일치한 결과를 보인 2검체는 약제 감수성 검사에서 INH 감수성인데도 MTBDR*plus*에서 *katG* 변이인 제18번 검체와 *inhA* 변이인 제19번 검체로, 검체에서 직접 실시한 REBA MTB-MDR검사는 MTBDR*plus*와 일치한 결과였는데 배양된 균주로 MTBDR*plus* 검사를 실시했을 때 둘 다 *inhA* C15T 변이가 관찰되었다. 이처럼 유전형과 약제 감수성 검사 결과가 차이를 보이는 것은 감수성 균주와 내성 균주가 동시에 존재하는 불균질 내성(heteroresistance)일 가능성이 있다[30]. 우즈베키스탄 지역 35명 환자에서 채취된 객담검체와 검체에서 배양된 균주로 시행한 MTBDR*plus* 검사결과에서 7검체(20%)가 서로 다른 결과를 보여 불균질 내성의 빈도가 상당히 높음을 보여주었다[29]. 이런 불균질 내성의 기전은 혼합감염 또는 동일 클론의 일부가 내성을 획득한 경우인데, 제19번 검체는 검체와 배양균주에도 동일하게 *inhA* C15T 변이가 검출되어 INH 내성 유전자형을 가진 균주가 있으나 약제가 감수성인 것으로 해석할 수 있다. 제18번 검체는 검체에서 *katG* S315T1 변이가 양성이고 배양균주는 *inhA* C15T 변이가 양성으로 두 가지 내성 유전자 균주가 섞여있고 약제는 여전히 감수성인 불

균질 내성일 것으로 해석된다. 제18, 19번 검체 둘 다 초치료 환자의 검체였는데 제18번 검체는 RIF 내성으로 다제내성 결핵일 확률이 높고 임상적으로도 일차약제 치료에 실패했다. 이에 비해 제19번 검체는 *inhA* 변이를 보였지만, 일차약제에 잘 반응하여 INH의 불균질 내성이 일차약제 치료의 반응을 결정하는데 어떤 영향이 미치는지 추후 더 연구가 필요하다.

결론적으로 MTBDR*plus*는 항산균 도말 ±인 검체부터 4+인 검체까지 적용하여 우수한 민감도와 특이도를 보였고 *rpoB* S531L, *rpoB* H526Y와 *katG* S315T1, *inhA* C15T 변이가 RIF과 INH의 주요 내성 유전형이었다. 특히 RIF은 약제 감수성 결과와 유전자형이 100% 일치했다. 하지만 INH는 MTBDR*plus*에서 감수성이라도 약제내성검사에서 내성일 수 있기 때문에 약제내성검사를 확인할 필요가 있다. *katG*, *inhA* 돌연변이 양성인데 약제내성검사에서 IHN 감수성인 균주에 대해서는 추후 더 연구가 필요하다.

요 약

배경: GenoType MTBDR*plus*는 결핵균 동정과 RIF, INH 내성을 동시에 진단하는 검사이다. 본 연구에서는 호흡기 검체에서 직접 MTBDR*plus* 검사를 실시하여 배양된 균주의 내성검사 결과와 비교하였다.

방법: 2007년 12월부터 2008년 7월까지 RIF 또는 INH에 내성인 19검체를 포함한 항산균 도말 양성이면서 배양 양성인 호흡기 검체 40검체를 대상으로 하였다. 검체에서 DNA를 추출하여 MTBDR*plus* 검사를 실시하였고, 약제내성검사는 결핵연구원에서 절대농도법으로 시행하였다.

결과: 40검체의 항산균 도말 결과 ±는 7개, 1+는 8개, 2+는 9개, 3+는 9개, 4+는 7개였다. MTBDR*plus*에서 결핵균 특이 띠가 양성인 37검체 중 RIF 내성 유전형은 12검체, INH 내성 유전형은 16검체에서 검출되었다. RIF 내성 검체에서 *rpoB* S531L 변이가 58.3% 검출되었고, INH 내성 검체에서 *katG* S315T1 변이가 53.3%, *inhA* C15T 변이는 31.3% 검출되었다. 약제 감수성 검사와 비교해서 MTBDR*plus* 검사의 RIF에 대한 민감도와 특이도는 모두 100%였고 INH는 민감도 82.4%, 특이도 90%였다. INH MTBDR*plus* 결과와 약제 감수성 결과가 일치하지 않았던 5검체 중 INH 감수성 유전자형을 보인 3검체가 약제 감수성 검사에서 내성이었고, *katG* S315T1 변이와 *inhA* C15T 변이를 보인 2검체가 약제내성검사에서 감수성이었다.

결론: MTBDR*plus*는 항산균 도말이 ±인 검체부터 4+인 검체까지 적용할 수 있다. MTBDR*plus*에서 RIF 내성을 예측하는 신뢰도는 매우 높았지만 INH 내성 예측도는 상대적으로 떨어져서 약제내성검사로 확인할 필요가 있다.

참고문헌

1. 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.
2. Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. N Engl J Med 1998;338:1641-9.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006; 55:301-5.
4. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH, et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. Chest 2009;136:420-5.
5. Wright A, Zignol M, Van Deun A, Falzon D, Gerdes SR, Feldman K, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Lancet 2009;373:1861-73.
6. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1376-95.
7. The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Tuberculosis 2005. Seoul: The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Disease, 2005.
8. Pfyffer GE. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC: ASM press, 2007:1223-36.
9. Chang CL, Park TS, Kim MN, Lee NY, Lee HJ, Suh JT. Survey on changes in mycobacterial testing practices in Korean Laboratories. Korean J Clin Microbiol 2001;4;108-14.
10. 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.
11. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType

 DOI 10.3343/lmo.2011.1.1.4

MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. J Clin Microbiol 2007;45:2635-40.
12. 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 Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol 2005;43:3699-703.
13. Chang C and Jeong J. Mycobacteria, Nocardia and other aerobic Actinomycetes. In: Korean Society for Laboratory Medicine. Laboratory Medicine 4th edi. Seoul: E*PUBLIC, 2009:504-5.
14. 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.
15. Brossier F, Veziris N, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of MTBDR plus for detecting high/low levels of Mycobacterium tuberculosis resistance to isoniazid. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13:260-5.
16. Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Zerolo J, Casal M. Evaluation of new GenoType MTBDRplus for detection of resistance in cultures and direct specimens of Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2008;12:1456-60.
17. Huang WL, Chen HY, Kuo YM, Jou R. Performance assessment of the GenoType MTBDRplus test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2009;47:2520-4.
18. Huyen MN, Tiemersma EW, Lan NT, Cobelens FG, Dung NH, Sy DN, et al. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. BMC Infect Dis 2010;10:149.
19. Lacoma A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzano J, Haba L, Roses S, et al. GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains and clinical samples. J Clin Microbiol 2008;46:3660-7.
20. Lin HH, Kim HY, Yun YJ, Park CG, Kim BJ, Park YK, et al. Mutations of *katG* and *inhA* in MDR *M. tuberculosis*. Tuberc Respir Dis. 2007;63:128-38.
21. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am J Respir Crit Care Med 2008;177:787-92.
22. Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Simak T, Malomanova N, Fedorin I, Drobniewski F. Performance of the Genotype MTBDRPlus assay in the diagnosis of tuberculosis and drug resistance in Samara, Russian Federation. BMC Clin Pathol 2009;9:2.
23. Anek-Vorapong R, Sinthuwattanawibool C, Podewils LJ, McCarthy K, Ngamlert K, Promsarin B, et al. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. BMC Infect Dis 2010;10:123.
24. 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.
25. Miotto P, Piana F, Cirillo DM, Migliori GB. Genotype MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2008;46:393-4.
26. Ahmad S and Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respir Med 2009;103:1777-90.
27. Hazbon 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.
28. 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.
29. Hofmann-Thiel S, van Ingen J, Feldmann K, Turaev L, Uzakova GT, Murmusaeva G, et al. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of Mycobacterium tuberculosis in Tashkent, Uzbekistan. Eur Respir J 2009;33:368-74.
30. Rinder H, Mieskes KT, Loscher T. Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2001;5:339-45.