

# 항결핵제 감수성검사를 위한 Advansure™ MDR-TB Genoblot Assay Kit의 수행능 평가

## Performance Assessment of Advansure™ MDR-TB Genoblot Assay Kit for Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Test

한상봉 · 조용준 · 유진경 · 김용구 · 박연준

Sang Bong Han, M.D., Yongjun Jo, M.D., Jin Kyung Yu, M.S., Yonggoo Kim, M.D., Yeon-Joon Park, M.D.

가톨릭대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background:** Because of the long time required for conventional drug susceptibility test (DST) for rifampin and isoniazid, development of rapid DSTs is necessary. Recently, the AdvanSure™ MDR-TB GenoBlot Assay kit (LG Life Science, Korea), using reverse hybridization line blot assay, was developed. We compared this kit with Genotype® MTBDRplus (HAIN Lifescience, Germany) and conventional DST.

**Methods:** Of the DNAs preserved after performing DST by using Genotype®, we selected 144 samples having conventional DST results. The experiments with both the kits were performed according to the manufacturers' instructions. For the samples for which discrepant results were obtained, sequencing was performed if the DNA was available. Conventional DST was performed at the Korean Institute of Tuberculosis by using the absolute concentration method.

**Results:** For rifampin, the findings obtained using both the kits were the same with concordance rates of 98.6% (142/144) compared to conventional DST. Of the 2 discrepant findings, one was very major error and the other was major error. For isoniazid, compared to conventional DST, concordance rates of AdvanSure™ and Genotype® were 95.8% (138/144) and 95.1% (137/144) respectively. Of the 6 discrepant findings between conventional method and Advansure™, 5 were very major error and one was major error. All the 7 discrepant findings between conventional method and Genotype® were very major error.

**Conclusions:** The findings obtained using AdvanSure™ showed high concordance with those obtained using Genotype® and conventional DST. This kit has a higher rate of detection of isoniazid resistance because it includes probes for an additional target (*ahpC*).

**Key Words:** Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampin, Isoniazid, Molecular method

## 서 론

미국질병관리본부(CDC)와 세계보건기구(WHO)의 조사에 의하면, 2000년부터 2004년까지 전 세계 6대륙 49개국의 전체 결핵균 중 다제내성 결핵균(multidrug-resistant tuberculosis)과 광범위내

성 결핵균(extremely drug-resistant tuberculosis)이 차지하는 비율은 각각 20%와 2%였으며, 점점 증가하는 추세를 보였다[1]. 1993년부터 2002년까지 미국에서 다제내성 결핵균과 광범위내성 결핵균에 의한 사망률은 각각 25%와 33%였다[1]. 한국에서의 다제내성 결핵균은 증가 추세에 있고 전체 결핵균 중에서 다제내성 결핵균의 비율이 도말양성 신환자의 경우는 1994년 1.6%에서 2004년 2.7%로 유의하게 증가하였고, 과거 치료자의 경우도 1999년 7.1%에서 2004년 14.0%로 유의하게 증가하였다[2]. 또한 2000년도 이후 3년간의 매년 진단되는 다제내성 결핵환자의 수도 점차 증가하고 있으며, 한 해 약 4,000명 이상이 새로이 진단되는 것으로 추정된다[3].

따라서 다제내성 결핵의 적절한 치료와 전파 방지를 위해서는 신속하고 정확한 진단이 필수적이며, 이를 위해서 새로운 진단 검사법들이 개발되어 왔는데, MGIT susceptibility test, nitrate reductase assay, microscopic observation drug susceptibility assay, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

**Corresponding author:** Yeon-Joon Park, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 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

Received: July 16, 2011

Revision received: August 9, 2011

Accepted: August 12, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2012, 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.

test, broth microdilution method와 같은 배양을 기초로 한 방법들 [4]과 고체상 교잡법(solid-phase hybridization assay)을 이용한 INNO-LiPA Rif TB Assay (Innogenetics, Ghent, Belgium)와 Genotype® MTBDRplus (HAIN lifescience GmbH, Nehren, Germany), 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction) 기법, DNA 염기서열분석법, 바이오칩을 이용한 Microarrays 등의 분자진단적 방법들[5]이 이에 해당된다. 최근 국내에서 역교잡반응 기반법(reverse hybridization based assay)을 이용한 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit (LG Life Sciences, Seoul, Korea)가 개발되었고, 본 연구에서는 이 키트를 이용한 검사 결과를 Genotype® MTBDRplus와 통상적 약제감수성검사(conventional drug susceptibility test)를 이용한 검사 결과와 비교 분석하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

본 연구에서는 서울성모병원에서 결핵으로 진단받고 2008년 6월부터 2010년 3월 중에 Genotype® MTBDRplus 검사를 시행한 환자의 보관된 잔여 결핵균 DNA 중에서 통상적인 결핵균약제감수성검사를 실시하고 그 결과가 있는 DNA 검체 144개를 선별하였다.

### 2. Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit

Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit을 이용한 검사는 선별된 결핵균 144개의 DNA 검체로 제조사의 지침서에 따라 시행되었다. 즉, 원-튜브 네스티드 다중 비대칭 PCR법(one-tube nested multiplex asymmetric PCR method)으로, *rpoB* (RNA 중합효소의  $\beta$ -subunit)와 *katG* (catalase peroxidase) 유전자 부위 및 *inhA* (enoyl acyl carrier protein (ACP) reductase)와 *ahpC* (alkyl hydroperoxide reductase)의 촉진자(promoter) 부분이 증폭되었고, 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 streptavidin-alkaline phosphatase (AP) conjugate를 첨가시켜 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 4-nitro blue tetrazolium chloride와의 반응을 통해 푸른색의 발색을 관찰함으로써 확인하였고, 푸른색으로 발색된 띠의 패턴은 자동화 분석 장비인 AdvanSure™ GenoScan을 이용하여 그 농도를 측정하였다. 각 유전자의 야생형(wild-type)과 변이형(mutant) 탐색자들은 Table 1에 표기하였다. 제조사의 지침에 따라, 우선 야생형 띠의 농도와 변이형 띠의 농도 중 하나라도 2 이상일 경우에는, 변이형 띠의 농도와 야생형 띠의 농도의 비를 구해서 그 값이 1 이상일 때 그 약제에 대한 내성으로, 1 미만일 때는 감수성으로 판독하였다. 야생형 띠의 농도와 변이형 띠의 농도 모두 2

**Table 1.** Mutations in the *rpoB*, *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes and the corresponding wild-type and mutation probes in the AdvanSure™ MDR-TB GenoBlot Assay kit

| Wild-type probe (s)      | Codons analyzed                | Mutation probe | Mutation |
|--------------------------|--------------------------------|----------------|----------|
| <i>rpoB</i>              | RW1                            | RM11           | L511P    |
|                          |                                | RM12           | Q513P    |
|                          | RW2                            | RM21           | D516V    |
|                          |                                | RM22           | D516Y    |
|                          | RW3                            | RM3            | S522L    |
| <i>rpoB</i>              | RW4                            | RM41           | H526Y    |
|                          |                                | RM42           | H526D    |
|                          | RW5                            | RM51           | S531L    |
|                          |                                | RM52           | L533P    |
| <i>katG</i> *            | KW                             | KM             | S315T    |
| Wild-type probe (s)      | Analyzed nucleic acid position | Mutation probe | Mutation |
| <i>inhA</i> <sup>†</sup> | IW                             | IM             | C-15T    |
| <i>ahpC</i> <sup>†</sup> | AW                             | AM1            | G-6A     |
|                          |                                | AM2            | C-10A    |

\*to detect INH high level resistance; <sup>†</sup> to detect INH low level resistance.

Abbreviations: RW, *rpoB* wild type; RM, *rpoB* mutation type; KW, *katG* wild type; KM, *katG* mutation type; IW, *inhA* wild type; IM, *inhA* mutation type; AW, *ahpC* wild type; AM, *ahpC* mutation type; INH, isoniazid.

미만인 경우, 재검을 실시하였고 재검 역시 동일한 결과가 나왔을 때는 야생형 유전자의 소실에 의한 약제내성으로 판정하였다.

### 3. Genotype® MTBDRplus kit

Genotype® MTBDRplus kit은 제조사의 지침서에 따라 수행되었다. 추출한 결핵균의 DNA를 다중-PCR후 증폭산물을 *rpoB*, *katG*, *inhA*의 야생형과 변이형에 특이한 탐색자가 접합된 스트립에 교잡시키고, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate와 dimethyl sulfoxide가 포함된 기질을 첨가하여, 변이형 탐색자가 발색되거나 야생형 탐색자가 소실된 경우, 그 부위의 변이로 인한 내성으로 판독하였다. *rpoB*, *katG* 및 *inhA* 유전자의 야생형 탐색자와 변이형 탐색자는 Table 2와 같다. 정도관리 밴드인 Conjugate Control (CC), Amplification Control (AC), TUB, Locus Controls (*rpoB*, *katG*, *inhA*) 띠가 모두 양성일 때 결과를 판독하였고, 각 야생형 띠와 변이형 띠는 AC 띠와 비교해서 발색 정도가 같거나 더 강한 경우만 양성으로 판독하였으며, 야생형 띠가 음성이거나 변이형 띠가 양성인 경우 내성으로 판정하였다.

### 4. 통상적 약제감수성검사

통상적 약제감수성검사는 결핵연구원에 의뢰하여 실시하였다. 대한결핵연구원에서는 절대농도법을 이용하여 통상적 약제감수성검사를 실시하였고, rifampin (RIF)과 isoniazid (INH)가 각각 40

**Table 2.** Mutations in the *rpoB*, *katG*, and *inhA* genes and the corresponding wild-type and mutation probes in the Genotype® MTBDRplus kit

| Wild-type probe(s)  | Codons analyzed                | Wild-type loss | Mutation probe    | Mutation |
|---------------------|--------------------------------|----------------|-------------------|----------|
| <i>rpoB</i> WT1     | 505-509                        | F505L          |                   |          |
|                     |                                | T508A          |                   |          |
|                     |                                | S509T          |                   |          |
| <i>rpoB</i> WT2     | 510-513                        | L511P*         |                   |          |
| <i>rpoB</i> WT2/WT3 | 510-517                        | Q513L*         |                   |          |
|                     |                                | Q513P          |                   |          |
|                     |                                | del514-516     |                   |          |
| <i>rpoB</i> WT3/WT4 | 513-519                        | D516V          | <i>rpoB</i> MUT1  | D516V    |
|                     |                                | D516Y          |                   |          |
|                     |                                | del515         |                   |          |
| <i>rpoB</i> WT4/WT5 | 516-522                        | del518*        |                   |          |
|                     |                                | N518I          |                   |          |
| <i>rpoB</i> WT5/WT6 | 518-525                        | S522L          |                   |          |
|                     |                                | S522Q          |                   |          |
| <i>rpoB</i> WT7     | 526-529                        | H526Y          | <i>rpoB</i> MUT2A | H526Y    |
|                     |                                | H526D          | <i>rpoB</i> MUT2B | H526D    |
|                     |                                | H526R          |                   |          |
|                     |                                | H526P*         |                   |          |
|                     |                                | H526Q*         |                   |          |
|                     |                                | H526N          |                   |          |
|                     |                                | H526L          |                   |          |
|                     |                                | H526S          |                   |          |
|                     |                                | H526C          |                   |          |
| <i>rpoB</i> WT8     | 530-533                        | S531L          | <i>rpoB</i> MUT3  | S531L    |
|                     |                                | S531P          |                   |          |
|                     |                                | S531Q*         |                   |          |
|                     |                                | S531W          |                   |          |
|                     |                                | L533P          |                   |          |
| <i>katG</i> WT      | 315                            | S315T1         | <i>katG</i> MUT1  | S315T1   |
|                     |                                | S315T2         | <i>katG</i> MUT2  | S315T2   |
| Wild-type probe(s)  | Analyzed nucleic acid position | Wild-type loss | Mutation probe    | Mutation |
| <i>inhA</i> WT1     | -15                            | C-15T          | <i>inhA</i> MUT1  | C-15T    |
|                     | -16                            | A-16G          | <i>inhA</i> MUT2  | A-16G    |
| <i>inhA</i> WT2     | -8                             | T-8C           | <i>inhA</i> MUT3A | T-8C     |
|                     |                                | T-8A           | <i>inhA</i> MUT3B | T-8A     |

\*Thus far, this rare mutation has only been detected in silico. Therefore, its detection in vitro may not be possible.

μg/mL와 0.2 μg/mL가 포함된 Löwenstein-Jensen (L-J) 배지를 사용하였다.

## 5. DNA 염기서열분석

INH 내성검사 결과 중 통상적 약제감수성검사에서는 내성이었으나, 두가지 분자진단적 방법에서는 모두 감수성으로 나온 한 예의 경우는 추가로 DNA 염기서열분석을 실시하였다. 시발체(primer)

**Table 3.** The results of drug susceptibility test by the 3 methods

| Molecular methods |       | Conventional DST |     |       |     |     |       |
|-------------------|-------|------------------|-----|-------|-----|-----|-------|
|                   |       | RIF              |     |       | INH |     |       |
|                   |       | R                | S   | Total | R   | S   | Total |
| AdvanSure™        | R     | 18               | 1   | 19    | 20  | 1   | 21    |
|                   | S     | 1                | 124 | 125   | 5   | 118 | 123   |
|                   | Total | 19               | 125 | 144   | 25  | 119 | 144   |
| Genotype®         | R     | 18               | 1   | 19    | 18  | 0   | 18    |
|                   | S     | 1                | 124 | 125   | 7   | 119 | 126   |
|                   | Total | 19               | 125 | 144   | 25  | 119 | 144   |

Abbreviations: DST, drug susceptibility test; RIF, rifampin; INH, isoniazid; R, resistant; S, susceptible; AdvanSure™, AdvanSure™ MDR-TB GenoBlot (LG Life Science, Korea); Genotype® MTBDRplus (HAIN Lifescience, Germany).

는 *katG*-Forward (5'-TTT CGG CGC ATG GCC ATG A-3')와 *katG*-Reverse (5'-ACA GCC ACC GAG CAC GAC-3'), 그리고 *inhA*-Forward (5'-TCG ACG GCC GGC ATG G-3')와 *inhA*-Reverse (5'-CCG GTC CGC CGA ACG-3')를 사용하였으며, 그 증폭산물의 크기는 *katG*와 *inhA*가 각각 894 bp와 905 bp였다[6]. 이 증폭산물들은 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA)를 이용하여 제조사의 지침서에 따라 염기서열분석이 시행되었으며, 염기서열분석 결과는 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 자료와 비교하였다.

## 결 과

144개 검체의 세가지 검사법에서의 검사 결과는 Table 3과 같다. RIF의 경우, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay와 Genotype® MTBDRplus 두 검사 모두 내성검출에서의 민감도 94.7%, 특이도 99.2%, 내성예측률 94.7%, 감수성예측률 99.2%로 서로 일치하는 결과를 보였다. INH의 경우는 내성검출에서의 민감도, 특이도, 내성예측률, 감수성예측률이 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay에서는 80.0%, 99.2%, 95.2%, 95.9%를, Genotype® MTBDRplus에서는 72.0%, 100.0%, 100.0%, 94.4%를 보임으로서, 민감도와 감수성예측률에서는 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay가, 특이도와 내성예측률에서는 Genotype® MTBDRplus가 더 우수한 결과를 보였다.

AdvanSure™ MDR-TB Genoblot assay에서 재검을 실시해야 할 대상은 5검체였으며(Table 4), 이 중 4검체는 DNA가 보관 중이어서 재검을 실시하였고, 보관 DNA 부재로 재검을 실시하지 못한 나머지 1검체는 *katG* 유전자의 변이가 확인되어 INH 내성으로 판정하였다.

144개의 검체 중 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay에서 검출된 RIF과 INH에 내성인 검체는 각각 19개와 21개로서 Table 5와

Table 4. The results of 5 specimens that should be retested

| Drug      | No. | Concentration of band |                         | Result |
|-----------|-----|-----------------------|-------------------------|--------|
|           |     | First test            | Retest                  |        |
| Rifampin  | 1   | RW2 : 1.82            | RW2 : 1.01              | R      |
|           |     | RM21 : 0.67           | RM21 : -0.05            |        |
|           |     | RM22 : -0.95          | RM22 : -0.58            |        |
|           | 2   | RW5 : 1.09            | RW5 : 4.33              | R      |
|           |     | RM51 : 1.24           | RM51 : 8.52             |        |
|           |     | RM52 : -0.78          | RM52 : -0.28            |        |
| Isoniazid | 3   | KW : 1.79             | KW : 10.24              | S      |
|           |     | KM : -0.24            | KM : 0.69               |        |
|           | 4   | IW : 1.72             | X*                      | R      |
|           |     | IM : 0.74             | ( <i>katG</i> mutation) |        |
|           | 5   | AW : 1.95             | AW : 4.28               | S      |
|           |     | AM1 : 0.92            | AM1 : 0.83              |        |
|           |     | AM2 : 0.09            | AM2 : -1.26             |        |

\*Samples could not be retested because of the lack of preserved DNA.  
Abbreviations: RW, *rpoB* wild type; RM, *rpoB* mutation type; KW, *katG* wild type; KM, *katG* mutation type; IW, *inhA* wild type; IM, *inhA* mutation type; AW, *ahpC* wild type; AM, *ahpC* mutation type.

Table 5. The number of mutations associated with RIF and INH resistance detected by AdvanSure™ MDR-TB GenoBlot Assay

| Drug  | Conventional<br>DST | Wild-type loss<br>or Mutation probes  | Number            |
|-------|---------------------|---------------------------------------|-------------------|
| RIF   | R                   | RW2 loss                              | 1                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> L511P                     | 1                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> Q513P                     | 0                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> D516V                     | 4                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> D516Y                     | 1                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> S522L                     | 0                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> H526Y + <i>rpoB</i> H526D | 1                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> S531L                     | 9                 |
|       |                     | <i>rpoB</i> L533P                     | 1                 |
|       |                     | S                                     | <i>rpoB</i> L511P |
| Total |                     | 19                                    |                   |
| INH   | R                   | <i>katG</i> S315T                     | 10                |
|       |                     | <i>inhA</i> C-15T                     | 7                 |
|       |                     | <i>ahpC</i> G-6A + <i>ahpC</i> C-10A  | 1                 |
|       |                     | <i>ahpC</i> C-10A                     | 2                 |
|       | S                   | <i>ahpC</i> C-10A                     | 1                 |
| Total |                     | 21                                    |                   |

Abbreviations: DST, drug susceptibility test; RIF, rifampin; INH, isoniazid; R, resistant; S, susceptible; RW2, *rpoB* wild-type codon 514–520.

같다. 이 중 *rpoB* H526Y와 *rpoB* H526D는 한 검체에서 검출되었으며, *ahpC* C-10A와 *ahpC* G-6A가 동시에 검출된 검체도 1개 있었다. *rpoB* L511P 변이와 *ahpC* C-10A 변이를 보인 각 한 검체씩은 통상적 억제감수성검사에서는 감수성의 결과를 보였다.

각 분자진단적 방법과 통상적 억제감수성검사 결과의 일치율을 보면, 두 가지 억제내성검사 결과가 모두 일치하는 경우는 Ad-

Table 6. Discrepant findings of the three methods

| No. | AdvanSure™ MDR-TB GenoBlot |     |                             | HAIN Genotype® MTBDR <sub>plus</sub> |     |  | Conventional DST |     |
|-----|----------------------------|-----|-----------------------------|--------------------------------------|-----|--|------------------|-----|
|     | RIF                        | INH | Mutation                    | RIF                                  | INH | Mutation                               | RIF              | INH |
| 1   | S                          | S   |                             | S                                    | S   |  | S                | R   |
| 2   | S                          | S   |                             | S                                    | S   |  | S                | R   |
| 3   | R                          | S   | <i>rpoB</i> S531L           | R                                    | S   | <i>rpoB</i> S531L                      | R                | R   |
| 4   | S                          | S   |                             | S                                    | S   |  | R                | R   |
| 5   | R                          | S   | <i>rpoB</i> L511P           | R                                    | S   | <i>rpoB</i> WT2 loss                   | S                | S   |
| 6   | S                          | r   | AM2                         | S                                    | S   |  | S                | R   |
| 7   | R                          | r   | <i>rpoB</i> D516V, AM2      | R                                    | S   | <i>rpoB</i> D516V                      | R                | R   |
| 8   | R                          | r   | <i>rpoB</i> S531L, AM1, AM2 | R                                    | S   | <i>rpoB</i> S531L                      | R                | R   |
| 9   | R                          | S   | <i>rpoB</i> D516V           | R                                    | R   | <i>rpoB</i> D516V, <i>katG</i> WT loss | R                | R   |
| 10  | R                          | r   | <i>rpoB</i> S531L, AM2      | R                                    | S   | <i>rpoB</i> S531L                      | R                | S   |

\*Samples could not be retested because of the lack of preserved DNA.  
Abbreviations: DST, drug susceptibility test; RIF, rifampin; INH, isoniazid; R, resistant; S, susceptible; r, low resistance; WT, wild type; AM1, *ahpC* G-6A; AM2, *ahpC* C-10A; RW2, *rpoB* wild type.

vansure™ MDR-TB Genoblot assay와 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>가 동일하게 95.1% (137/144)였으며, 불일치를 보인 10검체는 Table 6과 같다.

RIF 내성검사에서는, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay의 검사결과와 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>의 검사결과가 100% (144/144)의 일치율을 보였고, 두 검사법의 통상적 억제감수성검사와의 일치율은 98.6% (142/144)였다. 이때 불일치를 보인 2검체 중 한 검체는 두 분자진단적 검사법에서 감수성을, 통상적 억제감수성검사에서는 내성을 보인 very major error였고, 다른 한 검체는 두 분자진단적 검사법에서는 내성을, 통상적 억제감수성검사에서는 감수성을 보인 major error였다.

INH 내성검사에서는 두 분자진단적 방법간의 일치율은 95.9% (139/144)였고, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay와 통상적 억제감수성검사와의 일치율은 95.8% (138/144)를, Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>와 통상적 억제감수성검사와의 일치율은 95.1% (137/144)였다. Advansure™ MDR-TB Genoblot assay에서 불일치를 보인 6검체 중 5검체는 very major error를 보였는데, 이 중 4검체는 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>에서도 감수성으로 보였으나, 나머지 한 검체는 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>에서는 통상적 억제감수성검사와 일치하는 내성을 보였다. 이는 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>에서는 *katG* 야생형 띠에서 반응이 없어 내성으로 판정되었지만, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay의 야생형 띠에서는 농도가 2 이상의 반응을 보여 내성을 검출하지 못한 경우였다. 불일치를 보인 6검체 중 나머지 한 검체는 통상적 억제감수성검사에서는 감수성을, Ad-

vansure™ MDR-TB Genoblot assay에서는 *abpC* 변이에 의한 저도 내성을 보이는 major error를 보였다. 이 검체의 경우 Genotype® MTBDRplus에서의 결과는 감수성을 보임으로써 통상적 약제감수성검사와 동일한 결과를 보여주었다. Genotype® MTBDRplus에서 불일치를 보인 7검체는 모두 very major error를 보였다. 이 중 4검체는 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay에서도 동일한 결과를 보였지만, 나머지 3검체는 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay에서는 *abpC* 변이에 의한 저도내성을 보임으로써 통상적 약제감수성검사와 일치하는 결과를 보여주었다.

INH 내성검사 결과 중 통상적 약제감수성검사에서는 내성으로, 두 분자진단적 검사법에서는 감수성으로 나온 4예 중 잔여 DNA가 있는 한 예에 대해서 *katG* gene과 *inhA* gene에 대한 DNA sequencing 검사를 추가로 실시하였다. 그 결과, *katG* gene에서 nucleotide 1027dupC가 발견되었다.

Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit으로의 검사에서, RIF에 감수성으로 판정된 군의 각 RIF 변이형 탐색자별 비(변이형 띠의 농도/야생형 띠의 농도)를 -0.20 이상에서 1.00 미만까지 0.1 간격의 구간별로 검체 개수를 보면 0.10-0.40 사이에 주로 분포하였고, 가장 높은 수치는 0.68로서, 내성의 판단 기준인 1.00에 가까워 판단하기에 애매한 수치는 존재하지 않았다. INH에 감수성으로 판정된 군도 같은 방식으로 각 INH 변이형 탐색자별 비(변이형 띠의 농도/야생형 띠의 농도)의 각 구간별 검체 개수를 보면 0.10-0.40 사이에 주로 분포하였으며, 가장 높은 수치는 0.79로서 역시 판단에 애매한 수치는 존재하지 않았다. RIF 내성으로 판정된 군의 9개의 RIF 변이형 탐색자별 비를 살펴보면, 최저값이 1.62로서 애매한 수치에 의해 판정이 어려운 경우는 없었다. INH 내성군의 경우는 한 검체에서 *abpC*-AM2 탐색자에서 그 비가 1.01로 판정이 애매한 결과가 나왔으나, 재검 실시 후 3.92가 되어 내성으로 쉽게 판정할 수 있었다. 이 검체를 제외하고는 INH 내성군 역시 INH 변이형 탐색자별 비를 보면, 최저값이 1.80으로서 애매한 수치는 없었다.

## 고 찰

저자들은 국내에서 최초로 개발된 다제내성 결핵 검출 키트인 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay을 Genotype® MTBDRplus와 비교하였다. 두 검사법은 모두 빠르고 편리한 다제내성 결핵균 검출검사이다. 내성검출 부위를 비교해보면, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit에는 *rpoB* gene의 L511P, Q513P, S522L 및 L533P 변이형의 탐색자가 포함되어 있어 각 코돈의 변이 유무를 알 수 있었지만, Genotype® MTBDRplus의 경우는 위 4개의 변이형 탐색자가 포함되어 있지 않아, 각 변이가 발생한 코돈의 위치는 알

수 없었고 각 코돈이 포함된 야생형 탐색자의 소실로써 내성 유무를 판단할 수 있었다. 본 연구에서도 세 검사법에서 불일치를 보인 한 검체의 경우, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit에서는 *rpoB* L511P 변이가 검출되었지만, Genotype® MTBDRplus에서는 코돈 511을 포함하고 있는 야생형 탐색자인 *rpoB* WT2의 소실로만 내성을 검출할 수 있었다. 하지만, 추후 이런 예들에 대해서는 염기서열분석을 통해 코돈 511의 변이를 검증할 필요가 있다고 생각된다. *rpoB* gene의 야생형 탐색자들이 포함하는 코돈의 범위를 보면, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit은 코돈 509-535, Genotype® MTBDRplus는 코돈 505-533이었다. *katG* gene의 야생형 탐색자의 범위는 Genotype® MTBDRplus 경우는 코돈 315만 포함하지만, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit은 코돈 313-319를 포함하고 있다. *inhA* gene의 경우도 Genotype® MTBDRplus 경우는 nucleotide -15와 -16만 야생형 탐색자에 포함되어 있는 반면, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit은 nucleotide -23에서 -2까지를 포함한다. 또한 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit의 경우는 Genotype® MTBDRplus는 없는 *abpC* gene 부위가 포함되어 있으며, 본 연구에서는 Genotype® MTBDRplus의 INH 감수성검사서 very major error를 보인 7검체 중 3검체는 *abpC* gene 변이를 검출할 수 있는 탐색자가 없는 데에 기인하였다.

이전의 Genotype® MTBDRplus의 평가 연구 결과를 보면, Huyen 등[7]이 남베트남의 110균주에 대한 연구에서 Genotype® MTBDRplus와 통상적 약제감수성검사(RIF 40 µg/mL and INH 0.2 µg/mL, L-J media, 비율법)와의 일치율은 RIF과 INH 모두 96.3% (106/110)를 보여, 본 연구의 Genotype® MTBDRplus의 통상적 약제감수성검사와의 일치율(RIF 97.9%, INH 95.9%)과 동등한 수준이었다. Huang 등[8]이 타이완의 272균주에 대한 연구 결과를 보면, Genotype® MTBDRplus와 통상적 약제감수성검사(Middlebrook 7H10 or 7H11 medium, agar proportion method)와의 일치율은 RIF이 96.0% (261/272), INH가 83.8% (228/272)였는데, RIF에서 불일치를 보인 11균주(4.0%)와 INH에서 불일치를 보인 44검체(16.2%)가 모두 very major error를 보였으며 INH가 RIF에 비해 4배정도 높은 불일치율을 보였다. INH에서 불일치를 보인 44개 검체중 DNA 염기서열분석을 통해 확인된 28검체의 변이를 살펴보면, *katG* gene 변이와 *inhA* gene의 다양한 부위에서의 변이가 각각 11검체(39.3%)와 3검체(10.7%)에서 발견되었는데, 이들은 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit과 Genotype® MTBDRplus 모두의 탐색자에 포함되어 있지 않는 영역에서의 변이여서 이러한 부위의 변이에 대한 국내 분리 균주들에서도 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 28검체 중 Genotype® MTBDRplus 검사의 탐색자에는 포함되어 있지 않는 *abpC* gene 영역의 변이가 18검체(64.3%)에서 발견되어 *abpC* gene의 포함이 INH 내성검출률 향

상에 크게 기여함을 알 수 있다. 본 연구에서는 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay로 검출된 21개의 INH 내성검체 중 *abpC*의 변이로 검출된 검체는 4개였다.

또한, Guo 등[9]이 biochip system을 비율법(RIF 40 µg/mL, INH 0.2 µg/mL, L-J media)과 절대농도법(RIF 50 µg/mL and 250 µg/mL, INH 1 µg/mL and 10 µg/mL, L-J media)을 동시에 실시한 통상적 약제감수성검사와 비교한 논문에서 두 검사법의 일치율을 보면 RIF은 92.6% (425/459), INH는 72.9% (226/310)이었으며, biochip과 DNA 염기서열분석의 결과는 100% 일치하였다. Very major error의 비율은 RIF이 3.7%, INH는 10.0%로 INH가 RIF에 비해 높았는데, 그 이유는 INH의 경우 *katG* gene의 codon 315와 *inhA* gene의 nucleotide -16에 대한 변이만을 검출하도록 설계되었기 때문으로 분석하였다.

통상적 약제감수성검사에서는 INH에 내성으로 판정되었으나, 두 분자진단적 방법에서는 위감수성을 보인 4예 중 1예에서 *katG* gene의 DNA sequencing 검사에서 nucleotide 1027dupC가 발견되었다. 이 nucleotide 1027 위치는 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay와 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>에서 야생형 탐색자나 변이형 탐색자로 설정되지 않는 부위로서, 두 분자진단적 검사에서 야생형 소실이 일어나지 않고 변이도 발견되지 않은 것이 설명된다. 하지만, 이 변이가 내성에 관여하는 지에 대해서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 나머지 3예는 보관 DNA의 부재로 인해, 추가적인 DNA sequencing 검사를 실시하지 못했다. 앞으로 이런 예들에 대한 DNA sequencing 검사를 통해 INH 내성에 관여하는 다른 gene들(*kasA*, *ndb*, *iniA*, *oxyR*, *furA* 등)[10-12]의 변이의 확인이 필요할 것으로 생각되며, 또한 INH의 내성에 관여하는 새로운 변이도 발견할 수 있을 것으로 생각된다.

두 검체의 경우, 통상적 약제감수성검사서 감수성을 보였으나, Advansure™ MDR-TB Genoblot assay에서는 각각 *rpoB*와 *abpC* 변이에 의한 RIF 내성과 INH 저도내성을 보였다. 이는 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay의 *rpoB*와 *abpC* 변이 탐색자가 위양성을 보인 경우와 통상적 약제감수성검사서 40 µg/mL의 RIF과 0.2 µg/mL의 INH에서도 결핵균이 자라지 않을 정도의 저도내성이거나 감수성 균주와 내성 균주가 동시에 존재하는 불균질 내성(heteroresistance)[13, 14]을 생각해 볼 수 있고, 불균질 내성의 원인으로는 혼합감염[13] 또는 동일 클론의 일부가 내성을 획득한 경우[13, 15]가 있다. Cho 등[16]이 L-J배지(RIF 40 µg/mL, INH 0.2 µg/mL)로 비율법을 이용한 통상적 약제감수성검사와 염기서열분석법을 비교한 논문에 의하면 통상적 약제감수성검사서 INH에 내성을 보인 53검체 중 16검체는 *inhA* C-15T 변이를 가졌고, 통상적 약제감수성검사서 INH에 감수성을 보인 88검체 중에는 3검체에서 *inhA* C-15T 변이를 보였는데, 이중 한 검체는 변

이 peak만을 보였지만, 나머지 2검체는 *inhA* -15C와 T의 혼합 peak를 보였다.

Advansure™ MDR-TB Genoblot assay에서 야생형 띠의 농도와 변이형 띠의 농도가 모두 2 미만으로 재검을 실시해야 할 대상은 총 5검체였는데, 재검을 실시할 수 있었던 4검체 중 3검체는 야생형 띠의 농도나 변이형 띠의 농도가 2 이상으로 나왔다. 이는 검체의 야생형 소실이 아닌 검사 과정의 오류로 생각할 수 있고, 제조사의 지침서에 의하면 그 이유로서 교잡반응시의 부정확한 온도와 불충분한 반응시간, 세척반응에서의 과도한 반응시간을 제시하고 있다.

본 연구는 통상적 약제감수성검사 결과를 기준으로 RIF과 INH에 내성인 검체가 각각 19개와 25개로서 그 개수가 적고, 각 약제당 여러 내성 유전자의 변이가 관여하는 것을 감안할 때, 연구 검체수의 부족에 대한 한계점이 있다. 또한, 새로운 키트를 평가함에 있어서 비교 검사 외에 정밀도, 검출한계, 교차반응의 검증을 시행하지 못한 한계점도 있다.

결론적으로 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay는 통상적 약제감수성검사와 비교하여 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>와 유사한 일치율을 보였으며, INH 내성검사서 *abpC* gene을 포함하는 장점이 있었다. 하지만, 1예에서는 *katG* 야생형 소실을 검출하지 못하여, 야생형 소실로 인한 내성검출에 대해서는 보완이 필요하며, 추후 이런 예에 대해서는 염기서열분석을 통해 검증이 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경:** RIF와 INH에 대한 통상적 약물감수성검사는 긴 검사시간 때문에 더 빠른 검사법의 개발이 필요하다. 최근 역교잡 라인 블롯법을 이용한 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay kit (LG 생명과학, 한국)이 개발되었고, 본 연구에서는 이 kit를 Genotype® MTBDR<sub>plus</sub> (HAIN lifescience, 독일)와 통상적 약제감수성검사법과 비교하였다.

**방법:** Genotype® MTBDR<sub>plus</sub>로 검사한 뒤, 보관된 DNA 검체들 중에서 통상적 약제감수성검사 결과가 있는 144검체를 선별하였다. 두 kits는 제조사의 지침서에 따라 검사가 이루어졌고, 불일치를 보이는 검체들 중 보관된 유용한 DNA가 있는 검체는 DNA 염기서열분석을 시행했다. 통상적 약제감수성검사는 대한결핵연구원서 절대농도법(RIF, 40 µg/mL; INH, 0.2 µg/mL)으로 시행되었다.

**결과:** RIF의 경우, 두 분자진단적 방법은 동일한 결과를 보였고, 두 분자진단적 검사법과 통상적 약제감수성검사와의 일치율은 98.6% (142/144)였다. 불일치를 보인 2개의 결과 중 하나는 very major error이었고, 나머지 하나는 major error이었다. INH의 경우는, 통

상적 약제감수성검사와의 일치율은 Advansure™ MDR-TB Genoblot assay와 Genotype® MTBDRplus가 각각 95.8% (138/144), 95.1% (137/144)였다. Advansure™ MDR-TB Genoblot assay가 통상적 약제감수성검사와 불일치를 보인 6개의 결과 중 5개는 very major error이었고, 1개는 major error이었다. Genotype® MTBDRplus가 통상적 약제감수성검사와 불일치를 보인 7개 결과는 모두 very major error이었다.

**결론:** Advansure™ MDR-TB Genoblot assay는 Genotype® MTBDRplus 및 통상적 약제감수성검사와 높은 일치율을 보여주었고, 추가 표적유전자(*abpC*)에 대한 탐색자를 포함함으로써 더 높은 INH 내성검출률을 보였다.

## 감사의 글

본 연구는 LG 생명과학의 용역연구로 수행되었습니다.

## 참고문헌

- 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.
- Bai GH, Park YK, Choi YW, Bai JI, Kim HJ, Chang CL, et al. Trend of anti-tuberculosis drug resistance in Korea, 1994-2004. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11:571-6.
- 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.
- Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2093-8.
- Shin DH. New diagnostic methods for *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Korean Med Assoc 2006;49:773-80.
- Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 2007:1255.
- 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.
- 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.
- Guo Y, Zhou Y, Wang C, Zhu L, Wang S, Li Q, et al. Rapid, accurate determination of multidrug resistance in *M. tuberculosis* isolates and sputum using a biochip system. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13:914-20.
- Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. PloS Med 2009;6:e2.
- Tuberculosis drug resistance mutation database. <http://www.tbdreamdb.com/INH.html> (Updated on April 2010).
- Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P, Masjedi MR, Velayati AA. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iran. Microb Drug Resist 2008;14: 273-9.
- 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.
- Rinder H, Mieskes KT, Löscher T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2001;5:339-45.
- Woodford N and Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. Clin Microbiol Infect 2006;13:5-18.
- 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.