

Original Article

항산균 검출을 위한 세가지 실시간 중합효소연쇄반응
시약의 진단 성능 평가김상욱^{1*}, 박영희^{2*}, 고영진^{1,3}, 김윤호², 김창현², 임채승¹고려대학교 ¹의과대학 진단검사의학과, ²의료원 구로병원 진단검사의학과, ³조선대학교 의과대학 진단검사의학과Evaluation of Diagnostic Performance of
Three Real-Time PCR Assays for the Detection
of Mycobacteria SpeciesSang-wook Kim^{1*}, Young-Hee Park^{2*}, Young Jin Ko^{1,3}, Yoon Ho Kim², Chang Hyun Kim², Chae Seung Lim¹Department of Laboratory Medicine, ¹Korea University College of Medicine, Seoul, ²Korea University Medical Center Guro Hospital, Seoul, ³Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

*These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

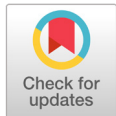
Background: The disease burden caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) complex continues to decrease in most countries. However, the diseases caused by the nontuberculous mycobacteria (NTM) become a public health problem. This study aimed to compare the diagnostic accuracy of three real-time PCR assays: AdvanSure TB/NTM real-time PCR kit (AdvanSure; LG Chem., Korea), Genedia MTB/NTM detection kit (Genedia; Green Cross MS, Korea), and PowerChek MTB/NTM Real-time PCR kit (PowerChek; Kogenebiotech, Korea) for the detection of MTB complex and NTM.

Methods: Total 102 acid-fast bacilli (AFB) smear-positive and 177 smear-negative specimens from Korea University Medical Center, Guro Hospital, were enrolled. The AFB smear-positive and negative specimens were collected from November 2016 to October 2017 and November to December 2018, respectively. DNA extraction was performed using Genedia Mycobacteria DNA prep Kit (Green Cross MS, Korea). The statistical analysis was performed using MedCalc 18.11.6 (MedCalc Software, Belgium).

Results: Among 261 specimens, 64 showed MTB complex growth and 28 exhibited NTM growth. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of AdvanSure/Genedia/PowerChek kits for MTB were 96.9%/95.3%/96.9%, 98.5%/99.5%/98.5%, 58.9%/80.9%/58.9%, and 99.9%/99.9%/99.9%. Whereas those for NTM detection were 81.5%/44.4%/88.9%, 99.6%/100.0%/98.7%, 57.3%/100.0%/32.8% and 99.9%/99.6%/99.9%, respectively. The area under the receiver operating characteristic curve of AdvanSure and PowerChek for NTM detection was statistically different from that of Genedia ($P<0.0001$).

Conclusion: Three real-time PCR assays were reliable for MTB complex in AFB-positive and -negative specimens. There was a difference between these three reagents for the accuracy of NTM detection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Nontuberculous mycobacteria, Real-time PCR



OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585

eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2020 March, 23(2): 93-104
<https://doi.org/10.5145/ACM.2020.23.2.6>

Corresponding author

Young Jin Ko MD. PhD.

E-mail: yjko@chosun.ac.kr

Tel: +82-62-220-3697

Fax: +82-62-232-9123

Received: November 19, 2019

Revised: December 29, 2019

Accepted: December 29, 2019

© 2020 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/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

결핵은 전 세계 10대 사망원인 중 하나이며 인간면역결핍바이러스(HIV)로 인한 사망자를 넘어서는 질병으로 매년 수백만 명의 사람이 감염되고 있다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서는 2035년까지 결핵을 퇴치하기 위한 결핵 퇴치 전략을 내세우고 전세계적인 협력을 촉구하고 있으며, 이러한 노력의 일환으로 전세계 결핵발생률이 꾸준히 감소하고 있다[1]. 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)은 자연에 흔히 존재하며 HIV 감염환자, 악성종양 환자 등의 면역저하 환자뿐만 아니라 면역 정상인 사람에서 만성 폐질환, 림프절염, 피부질환, 파종성 질환 등을 일으키며 그 발생률이 증가하고 있다[2-4]. 또한, 비결핵항산균에 의한 감염증 가운데 폐질환은 비결핵항산균 감염증의 90%이상을 차지하며, 섬유공동형 비결핵항산균 폐질환의 경우 폐결핵과 매우 유사한 형태를 보인다[5]. 비결핵항산균 폐질환의 진단에는 원인균의 분리과 동정이 중요한데, 치료 약제가 분리되는 균종에 따라 다르기 때문이다. 또한, 치료 시작을 결정하기 어려우며, 부작용으로 인한 치료 중단이 흔해 치료에 어려움이 있다[5]. 따라서, 결핵의 전파 방지와 불필요한 결핵 치료를 막기 위해서 결핵과 비결핵항산균 폐질환을 감별하는 것이 중요하다[6].

항산균(acid-fast bacilli, AFB)감염을 선별하기 위해 의뢰되는 AFB 도말은 가격이 저렴하고 비교적 신속하게 결과를 제공해 줄 수 있어 현재까지 의심환자에서 시행하는 것을 권고하고 있다[7]. 핵산증폭검사 방법은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)의 검출에 있어서 우수한 민감도를 나타내 AFB 도말 양성검체에서 핵산증폭검사 음성 결과를 보이면 잠정적으로 NTM으로 진단할 수 있다[5,8].

AFB 배양검사는 결핵검사의 표준방법(gold standard)으로 진단에 필수적이지만 2주에서 8주간의 시간이 걸린다는 단점이 있다. 하지만, 항산균 동정검사 결과로 치료의 방향을 결정할 수 있고 약제 감수성검사에 필요한 균 집락을 얻기 위해서 배양검사가 반드시 필요하다[9]. 시약 성능이 잘 알려진 결핵균과는 달리 본 연구에 포함된 세가지 핵산증폭검사 시약의 비결핵항산균에 대한 성능 평가 연구는 비교적 적다[10,11]. 또한, 비결핵항산균의 진단시약 성능은 AFB 도말 양성 검체의 경우 90% 이상으로 비교적 우수한 편이나 AFB 도말 음성 검체의 경우 진단 시약에 따라 그 성능에 차이가 있는 것으로 알려졌다[12].

이에, 저자들은 현재 국내에서 주로 사용하고 있는 결핵균과 비결핵항산균을 검출하기 위한 세 가지의 실시간 중합효소 연쇄반응 시약인 AdvanSure™ TB/NTM real-time PCR kit (AdvanSure; LG Chem., Korea)와 Genedia® MTB/NTM detection kit (Genedia; Green Cross MS, Eumseong, Korea), PowerChek™ MTB/NTM Real-time PCR kit (PowerChek; Kogenebiotech, Seoul, Korea)의 진단 정확도를 AFB 음성 검체를 다수 포함하여 AFB 도말 결과에 따라 평가하고 차이 여부를 알아보고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

본 연구는 고려대학교 구로병원 진단검사의학과에서 2016년도 11월부터 2017년도 10월 31일까지 접수된 AFB 도말 양성 잔여검체 102개를 이용하여 수행하였으며, 특이도 평가를 위해 2018년 11월 10일부터 12월 3일까지 결핵/비결핵항산균 PCR 검사를 의뢰하였으며 같은 날 접수된 배양검사 의뢰가 있는 검체 가운데 AFB 도말검사 음성인 핵산 177건을 분석하였다. 모든 검체는 -70°C에서 냉동 보관되었던 검체로 검사하였다.

AFB 도말검사는 얻어진 호흡기 혹은 비호흡기 검체를 슬라이드 글라스에 직접 도말하거나 3000×g에서 15분간 원심분리를 하여 침사를 슬라이드 글라스에 도말하여 사용하였다. 객담과 같이 오염가능성이 있는 검체는 4% N-Acetyl-L-Cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) 혼합물을 동량으로 섞어 검체를 용해시킨 후 도말하였다. 염색은 Aerospray TB model 7722 장비(ELITech Group, Signes, France)를 사용하여 auramin-rhodamin 염색 후 형광현미경으로 관찰하였고, 양성 결과는 Carbol fuchsin (Ziehl-Neelsen) 염색으로 확인하였다. 항산균 도말검사는 미국흉부학회(American Thoracic Society)/미국질병관리본부(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)의 기준에 따라 판정하였다[13].

AFB 배양검사는 도말검사와 동일한 방법으로 전처리를 한 후 액체배지(VersaTREK Myco, ThermoFisher Scientific, Lenexa, KS, USA)와 2% Ogawa 배지(The Korean Institute of Tuberculosis, Cheongju, Korea)에 접종하였다. 액체배지와 고체배지는 Versa TREK system (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 및 비이산화탄소(non-CO₂) 배양기에서 각각 2, 6주간 배양하였다. 자란 균주를 대상으로 Ziehl-Neelsen 염색을 하여 양성인 경우, SD Biotec Ag MPT64 Rapid (SD, Yongin, Korea)를 이용한 결핵균 항원 검사를 시행하여 양성이면 결핵균으로 보고하고[14], 음성이면 Genedia MTB/NTM detection kit (Green Cross MS)를 이용한 실시간 PCR 검사를 사용하여 비결핵항산균 여부를 확인하였다. 비결핵항산균의 동정은 결핵연구원에 의뢰한 동일 검체의 결과를 참조하였다.

실시간 PCR 검사는 AdvanSure, Genedia, PowerChek의 세 가지 시약으로 검사를 진행하였다. 핵산추출은 제네디아 마이코박테리아 DNA추출키트(Green Cross MS, Eumseong, Korea)를 이용하여 수기로 추출하였으며, 동일 핵산을 세가지 시약 평가에 각각 사용하였다. 세 시약은 모두 목표 유전자가 결핵균은 IS6110이었고 비결핵항산균은 ITS로 동일하였다. AdvanSure는 SLAN 96 real time PCR system(LG Chem., Seoul, Korea) 장비를 이용하여 핵산을 증폭하였고 Genedia와 PowerChek은 CFX96 장비(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 핵산을 증폭하였다. PowerChek은 intermediate 결과를 나타냈는데 이는 양성과 음성의 경계를 나타낸 것으로 평가 결과 분석 시에는 음성으로 간주하였다.

일치도 분석을 위해 CLSI EP12-A2 지침에 따라 세가지 시약 각각과 AFB 배양검사 사이에 양성일치율(percent positive agreement)과 음성일치율(percent negative agreement), 전체일치율(overall percent agreement)을 계산하고 Cohen의 카파검정을 수행하였다[15,16]. 진단정확도 평가를 위해 표준검사법인 AFB 배양검사를 기준으로 민감도와 특이도, 양성예측도, 음성예측도를 계산하였다. ROC 곡선의 아래면적(area under the ROC curve, AUC) 비교를 통해 검사시약 사이에 성능의 차이가 있는지 비교하였다. 예측도(predictive value)를 구하는데 필요한 유병률은 같은 기간에 의뢰된 전체 검체의 평균 양성률에 따라 계산되었다.

다른 두 시약과 민감도 차이를 보였던 Genedia에 대해서는 89검체를 대상으로 CFX96 (Bio-Rad) 장비와 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument system (AB7500; Thermo fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 장비의 기기간 비교평가를 시행하여 핵산 증폭 기기에 따른 양성률의 차이가 있는지를 알아보았다.

통계분석은 일치율분석의 경우 CLSI EP12-A2의 계산식에 따라 분석하였고 진단정확도 평가는 MedCalc 18.11.6 (MedCalc Software, Ostend, Belgium)을 사용하였다.

RESULTS

분석에 사용된 AFB 도말검사 검체의 배양결과

총 102개의 AFB 도말 양성검체 가운데 배양결과 음성인 8개와 지속적으로 같은 환자에서 의뢰된 검체 9건을 제외하고 85개의 검체에서 핵산을 추출하였다. 객담이 60검체, 기관지 흡인액이 25검체였고 이 가운데 63건은 결핵균, 22건은 비결핵항산균이 자랐다. 비결핵항산균 가운데 *M. avium*이 4주, *M. abscessus*가 3주, *M. intracellulare*와 *M. massiliense*가 각각 2주, *M. szulgai*가 1주 동정되었으며, 두 가지 이상의 비결핵항산균이 같이 자란 건이 5건이었고 동정 의뢰가 없는 것이 5건이었다.

AFB 도말검사와 기존의 결핵균/비결핵항산균 실시간 PCR검사 음성으로 보고된 총 177개의 검체 가운데 170건이 음성이었으며, 1건은 결핵균이 자랐고, 6건은 비결핵항산균이 자랐다. 비결핵항산균으로 자란 6검체 중에서 1검체를 제외하고 균종 동정검사가 결핵연구원에 의뢰되었고 *M. avium*이 3주, *M. intracellulare*가 2주로 동정되었다(Table 1).

Table 1. The AFB culture results for the specimens of AFB smear negative and MTB/NTM real-time PCR negative

Specimen	Results				
	MTB	NTM	Negative	Subtotal	(%)
Sputum	0	3	68	71	(40.1)
Bronchial aspirate	0	2	46	48	(27.1)
Pleural fluid	1	1	25	27	(15.3)
Cerebrospinal fluid (CSF)	0	0	16	16	(9.0)
Ascites	0	0	9	9	(5.1)
Bronchoalveolar lavage (BAL)	0	0	2	2	(1.1)
Pericardial fluid	0	0	1	1	(0.6)
Tissue (biopsy)	0	0	1	1	(0.6)
Urine	0	0	1	1	(0.6)
Joint (synovial fluid)	0	0	1	1	(0.6)
Total	1	6	170	177	(100.0)

Abbreviation: AFB, acid-fast bacilli; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, nontuberculous mycobacteria.

AFB 도말검사 양성 및 음성 검체에 대한 정확도 평가

AFB 도말검사 양성검체는 85건을 증폭하였는데 배양검사 결과 결핵균은 63건, 비결핵항산균은 22건이었다. PCR검사 결과 AdvanSure의 결과는 MTB 62건, NTM 20건, 음성 3건이었다. Genedia의 결과는 MTB 61건, NTM 12건, 음성 12건이었다. PowerChek은 MTB 61건, NTM 20건, 음성 2건, MTB와 NTM 동시 양성인 2건이었다.

배양검사와 PCR검사 사이에 불일치를 보이는 경우는 AdvanSure 및 PowerChek에서 양성이었으나 Genedia는 음성이고 배양검사 결과 비결핵항산균이 자란 경우가 13건으로 가장 많았다 (Table 2). 모든 PCR검사서 결핵균 양성이었으나 배양검사에서 자라지 않은 것이 7건 있었다. 이는 모두 기존에 결핵으로 진단받고 치료받은 환자들이었다.

Table 2. Discrepant results among three real-time PCR assays and AFB culture in AFB smear positive specimens

Specimen type (No.)	AdvanSure	Genedia	PowerChek	No. of specimens	AFB culture results
Sputum (4), Bronchial aspirate (9)	NTM	Negative	NTM	13	NTM
Sputum (6), Bronchial aspirate (1)	MTB	MTB	MTB	7	No growth
Sputum (1)	MTB	Negative	MTB	1	MTB
Bronchial aspirate (1)	MTB	MTB	MTB, NTM	1	MTB
Sputum (1)	Negative	Negative	Negative	1	MTB
Sputum (1)	Negative	Negative	Negative	1	NTM (<i>M. intracellulare</i> + <i>M. massiliense</i>)
Bronchial aspirate (1)	Negative	Negative	NTM	1	NTM (<i>M. avium</i>)
Bronchial aspirate (1)	NTM	NTM	NTM, MTB	1	NTM (non-ID)

Abbreviation: AFB, acid-fast bacilli; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, nontuberculous mycobacteria, ID; identification.

AFB도말검사 음성검체 177건을 검사한 결과 AdvanSure에서는 음성이 170건, MTB 양성인 3건, NTM 양성인 3건, 재검 요망인 1건이었다. Genedia에서는 음성이 175건, MTB가 1건, 재검 요망인 1건이었다. PowerChek에서는 음성이 169건, MTB가 2건, NTM이 5건, 재검 요망인 1건이었다. 시약 결과 간에 정확도의 차이는 적었는데 AdvanSure와 PowerChek에서 양성인 반면 Genedia 음성인 결과는 4건으로 가장 많았고, 이 가운데 MTB가 검출되었으나 NTM만 자란 1건은 MTB로 치료중인 환자였다. AdvanSure와 Genedia에서 음성인 반면 PowerChek이 양성인 결과는 2건으로 비결핵항산균이 2건이었는데, 이 중 1건은 배양검사에서 비결핵항산균이었다. 나머지 1건은 동일한 핵산으로 재검을 하였는데 음성이어서 비특이적 반응이었거나 오염으로 간주하였다. 세 시약에서 동시에 재검 요망 검체가 1건 있었는데, Genedia는 핵산을 10배 희석하여 검사한 결과 음성으로 나왔고, AdvanSure와 PowerChek은 재검을 하지 못하여 최종 성능분석에서는 제외하였다 (Table 3).

Table 3. Discrepant results between three real-time PCR assays and AFB culture in AFB smear negative specimens

Specimen type	AdvanSure	Genedia	PowerChek	AFB culture
Sputum	NTM	Negative	NTM	No growth
Bronchial aspirate	NTM	Negative	NTM	NTM
Sputum	NTM	Negative	NTM	NTM
Pleural fluid	MTB	Negative	MTB	NTM
Sputum	Negative	Negative	NTM	NTM
Ascites	Negative	Negative	NTM	No growth
Sputum	MTB	Negative	Negative	NTM
Pleural fluid	Negative	Negative	Negative	MTB
Bronchial aspirate	Negative	Negative	Negative	NTM
Bronchial aspirate	MTB	MTB	MTB	No growth
Sputum	Retest is required	Retest is required	Retest is required	No growth

Abbreviation: AFB, acid-fast bacilli; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, nontuberculous mycobacteria.

세가지 시약의 결핵균과 비결핵항산균 배양과의 일치도 분석

결핵균 검출에 대한 항산균 배양결과와의 일치율을 보면 AdvanSure와 PowerChek의 양성일치율(95%신뢰구간)이 96.9% (89.3-99.1)로 같았고, Genedia시약의 경우 95.3% (87.1-98.4)로 모두 95% 이상의 결과를 나타냈다(Table 4). 음성일치율 또한 AdvanSure와 PowerChek이 98.5% (95.6-99.5)로 동일하였으며, Genedia는 99.5% (97.2-99.9)의 음성일치율을 나타냈다. 전체 일치율은 세가지 시약 모두 98% 이상의 동등한 결과를 보였다. 카파검정은 세가지 시약 모두 0.95 이상으로 배양검사결과와 almost perfect agreement를 나타냈다.

비결핵 항산균 검출에 대한 배양결과와의 일치율은 세가지 시약 사이에 차이를 나타냈는데 양성일치율이 AdvanSure, Genedia, PowerChek 각각 81.8%, 44.4%, 88.9%로 차이를 보였고 음성일치율은 큰 차이를 보이지 않아 전체일치율은 통계적 차이는 없었다. 카파검정에서는 Genedia는 0.59, AdvanSure와 PowerChek은 0.88로 각각 moderate agreement와 almost perfect agreement를 보여 차이를 나타냈다.

Table 4. Agreement between AFB culture tests and three real-time PCR assays for MTB and NTM detection (n=261)

Parameter	Target organism	AdvanSure		Genedia		PowerChek	
		Result	95% CI	Result	95% CI	Result	95% CI
PPA (%)	MTB	96.9	89.3-99.1	95.3	87.1-98.4	96.9	89.3-99.1
	NTM	81.8	65.6-91.4	44.4	27.6-62.7	88.9	71.9-96.1
PNA (%)	MTB	98.5	95.6-99.5	99.5	97.2-99.9	98.5	95.6-99.5
	NTM	99.6	97.6-99.9	100.0	98.3-100.0	98.7	96.2-99.6
Overall percent agreement (%)	MTB	98.1	95.6-99.2	98.5	96.1-99.4	98.1	95.6-99.2
	NTM	97.3	94.6-98.7	94.3	90.7-96.5	97.3	94.6-98.7
Kappa	MTB	0.95	0.90-0.99	0.96	0.92-1.00	0.95	0.90-0.99
	NTM	0.88	0.78-0.97	0.59	0.39-0.79	0.88	0.78-0.97

Abbreviation: PPA, percent positive agreement; PNA, percent negative agreement, MTB; *Mycobacterium tuberculosis*, NTM; nontuberculous mycobacteria; CI, confidence interval.

세가지 시약의 결핵균 검출에 대한 진단 정확도

AFB 도말 양성검체(n=85) 및 전체 검체(N=261)에서 결핵균 검출에 대한 최종 진단정확도는 세가지 시약의 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도에서 큰 차이가 없었다(Table 5). 또한, AdvanSure/Genedia/PowerChek의 AUC 및 95% 신뢰구간이 각각 0.98 (0.95-0.99)/0.97 (0.94-0.99)/0.98 (0.95-0.99)로 우수한 결과를 나타냈다. 다만, PowerChek의 양성예측도의 경우 유병율에 영향을 받아 연구결과 내의 결핵균 양성률인 74.1%를 적용하면 98.4%로 큰 차이가 없었으나 연구기간 평균 양성률인 2.2%를 가정한 경우 32.8%를 나타내 다른 시약과 큰 차이를 보였다(Table 5).

Table 5. Diagnostic accuracy of three real-time PCR assays for the MTB detection stratified by AFB smear results (n=261)

Parameter	AFB smear	AdvanSure		Genedia		PowerChek	
		Result	95% CI	Result	95% CI	Result	95% CI
Sensitivity (%)	Positive	98.4	91.5-100.0	96.8	89.0-99.6	98.4	91.5-100.0
	Negative	0.0	0.0-79.3	0.0	0.0-79.3	0.0	0.0-79.3
	Total	96.9	89.2-99.6	95.3	86.9-99.0	96.9	89.2-99.6
Specificity (%)	Positive	100.0	84.6-100.0	100.0	84.6-100.0	95.5	77.2-99.9
	Negative	98.3	95.1-99.4	99.4	96.8-99.9	98.9	95.9-99.7
	Total	98.5	95.6-99.7	99.5	97.2-100.0	98.5	95.6-99.7
PPV (%)	Positive	100.0	-	100.0	-	32.8	6.7-76.8
	Negative	Incomputable		Incomputable		Incomputable	
	Total	58.9	31.7-81.5	80.9	37.4-96.8	58.9	31.7-81.5
NPV (%)	Positive	100.0	99.8-100.0	99.9	99.7-100.0	100.0	99.7-100.0
	Negative	Incomputable		Incomputable		Incomputable	
	Total	99.9	99.7-100.0	99.9	99.7-100.0	99.9	99.7-100.0
AUC	Positive	0.99	0.94-1.00	0.98	0.93-1.00	0.97	0.91-1.00
	Negative	Incomputable		Incomputable		Incomputable	
	Total	0.98	0.95-0.99	0.97	0.94-0.99	0.98	0.95-0.99

Abbreviation: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; AUC, area under the ROC curve; CI, confidence interval.

세가지 시약의 비결핵항산균 검출에 대한 진단 정확도

비결핵항산균 검출에 대한 진단 정확도는 시약 사이에 차이를 나타냈는데, AFB 도말 양성검체의 AUC는 PowerChek이 0.97로 가장 높았고 AdvanSure도 비슷한 결과를 나타냈으나 Genedia는 0.77로 유의미하게 낮았다(Table 6). 이는 AFB 도말 음성과 양성 검체의 민감도 차이에서 비롯된 것으로 특이도는 모두 우수하였다. AFB도말 양성과 음성 전체 검체를 대상으로 진단정확도를 평가하였을 때, AdvanSure와 PowerChek의 AUC (95% CI)는 0.91 (0.86-0.94)과 0.94 (0.90-0.96)인 반면 Genedia는 0.72 (0.66-0.78)로 통계적으로 유의하게 차이가 있었다($P<0.0001$)(Table 6).

Table 6. Diagnostic accuracy of three real-time PCR assays for NTM detection stratified by AFB smear results (n=261)

Parameter	AFB smear	AdvanSure		Genedia		PowerChek	
		Result	95% CI	Result	95% CI	Result	95% CI
Sensitivity (%)	Positive	90.9	70.8-98.9	54.6	32.2-75.6	95.5	77.2-99.9
	Negative	40.0	5.3-85.3	0.0	0.0-52.2	60.0	14.7-94.7
	Total	81.5	61.9-93.7	44.4	25.5-64.7	88.9	70.8-97.6
Specificity (%)	Positive	100.0	94.3-100.0	100.0	94.3-100.0	98.4	91.5-100.0
	Negative	99.4	96.8-100.0	100.0	97.9-100.0	98.8	95.8-99.9
	Total	99.6	97.6-100.0	100.0	98.4-100.0	98.7	96.3-99.7
PPV (%)	Positive	100.0	73.5-100.0	100.0	73.5-100.0	29.8	5.7-74.8
	Negative	32.5	4.9-81.8	Incomputable		26.6	7.1-63.1
	Total	57.3	15.9-90.5	100.0	73.5-100.0	32.8	13.6-60.3
NPV (%)	Positive	99.9	99.8-100.0	99.7	99.5-99.8	100.0	99.8-100.0
	Negative	99.6	99.1-99.8	99.3	99.3-99.3	99.7	99.2-99.9
	Total	99.9	99.7-99.9	99.6	99.5-99.7	99.9	99.8-100.0
AUC	Positive	0.96	0.89-0.99	0.77	0.67-0.86	0.97	0.91-1.00
	Negative	0.70	0.62-0.76	0.50	0.42-0.58	0.79	0.73-0.85
	Total	0.91	0.86-0.94	0.72	0.66-0.78	0.94	0.90-0.96

Abbreviation: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; AUC, area under the ROC curve; CI, confidence interval.

Genedia 시약에 대한 장비간 비교평가

결핵균 양성 검체(n=69)에서는 CFX96 장비에 비해 AB7500 장비에서 검사하였을 때 Ct값이 2 cycle 정도 일정하게 미뤄지는 결과를 나타냈다($P<0.0001$). 비결핵항산균 양성 검체(n=22)에서는 정성결과의 차이는 거의 없었으나 평균적으로 AB7500 장비에서 0.6 cycle 더 당겨진 결과를 나타냈다($P=0.02$). CFX96 장비를 사용하여 판정기준 Ct값(cut-off value of threshold cycle, Ct) 이내의 검체만을 대상으로 검사했으며 정성결과에서 Genedia에 대해 장비간 큰 성능차이를 볼 수는 없었으나 Genedia의 결핵균 및 비결핵항산균 검출에 대한 판정 기준치(cut-off value) 검증의 필요성이 있었다.

DISCUSSION

이 연구는 결핵균과 비결핵항산균을 동시에 검출할 수 있는 실시간 PCR 검사 세가지 시약을, 함께 의뢰된 AFB 배양검사와 비교하여 그 진단 정확도를 평가한 연구이다. 기존 연구에 따르면, AdvanSure와 Genedia, PowerChek의 진단 정확도는 AFB 도말 결과와 검체의 종류에 따라 차이가 있었으며, 저자들의 연구결과에서도 이러한 차이를 나타냈다[11,17,18].

또한 AFB 도말 음성이면서 결핵/비결핵항산균 실시간 PCR 검사에서 음성으로 판명되었으나 배양검사 결과가 있는 검체를 다수 사용하여 낮은 농도의 결핵균 및 비결핵항산균 핵산을 가진 검체에서 검사의 특이도를 평가했다. 이를 통해서 핵산증폭검사 및 AFB 도말검사서 음성이었으나 배양에서 양성인 결과를 7건 발견하였고, 6건이 비결핵항산균, 1건이 결핵균으로 자랐다. 표준 검사법인 항산균배양법과 비교했을 때, 결핵균의 경우 95%이상의 우수한 민감도를 나타냈으나 비결핵항산균에서는 그 성능의 차이를 확인할 수 있었다. 다만, AFB 도말 음성 검체에서는 결핵균이 자란 검체가 1건이었기 때문에 결핵균에 대해서는 성능평가가 어려웠다.

결핵균의 경우 위양성 결과가 나왔을 경우 불필요한 치료의 위험성이 있다. 특히, AFB 도말검사 양성인 경우 과거력에서 결핵이 있는 경우 결핵 재발을 배제하기 어려워 결핵치료약제를 복용할 가능성이 존재한다. 본 연구에서 PowerChek의 경우 intermediate라는 결과를 나타내 회색지대(Grey zone)를 두고 있는데 이러한 결과는 해석하는데 모호하다는 문제가 있었다. 하지만 MTB intermediate로 나온 결과 3건 중 1건과 NTM intermediate로 나온 5건 중 1건이 배양결과에서 비결핵항산균으로 자랐다. 또한 결핵 과거력이 있는 환자에서 지속적으로 비결핵항산균이 자랐으나 MTB와 NTM 동시양성으로 보고한 사례가 1건 있었다. 이는 결핵과 비결핵항산균의 동시 검출과 결핵균 단독 검출을 감별하기 위해서 단순히 Ct값을 사용하기 때문일 것으로 위양성률을 높이는 원인으로 판단되었다. 위양성 결과가 나온 경우 불필요한 약제 복용의 가능성이 있으므로 이 연구에서는 모두 음성으로 간주하고 정확도 결과를 계산하였으며 이와 같이 검사실에서는 이를 해석하는 기준을 자체적으로 만드는 것이 필요하였다. 또한, 비결핵항산균 검출에 대한 민감도가 가장 높아 AdvanSure와 함께 비결핵항산균 검출에 유용할 것으로 판단되었다.

최근 결핵균 퇴치를 위해서 확진 환자 치료뿐 아니라 잠복결핵 및 보균환자를 조기에 발견하여 전파를 방지하는 것이 중요하게 되었으며[1] 의료기관에서는 전파가 가능한 결핵의심환자를 신속하게 선제 격리하는 것이 무엇보다 중요하게 되었다. 결핵과 비결핵항산균 폐질환은 임상양상이 유사하고 영상의학적 소견으로 감별하기 어렵기 때문에 이를 신속하게 구분하는 방법이 더욱 필요한 실정이며 국내의 비결핵항산균 검출률은 해마다 증가하고 있다[19]. 한편, Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) 검사는 검체로부터 직접 *mpoB* 유전자 및 이 유전자의 돌연변이 여부를 검출함으로써 결핵균을 검출하고 다제내성 여부를 판단하는데 시간이 적게 소요되며, 비교적 우수한 민감도와 특이도를 나타내 세계보건기구에서는 다제내성 결핵 의심 환자나 HIV연관 결핵환자에서 초기 진단에 사용하도록 권고하고 있다[20]. 본 연구에서 평가한 세가지 결핵균/비결핵항산균 실시간 PCR시약은 결핵균 검출에 있어서 기존에 보고된 Xpert MTB/RIF (Cepheid)와 비슷한 정도의 AUC를 나타내 결핵을 조기 진단하는데 도움이 될 것으로 생각된다[21,22].

저자들은 결핵균과 비결핵항산균 검출에 대한 세가지 실시간 PCR시약의 진단정확도를 비교 평가하였다. 세가지 시약 모두 결핵균 및 비결핵항산균 검출에 대해 과거 문헌과 비교하여 좀 더 우수한 민감도 특이도를 보였다[17,18]. 각각의 시약의 성능은 결핵균 검출에는 차이가 없었으나 비결핵항산균 검출에서는 Genedia의 민감도가 다른 두 시약과 큰 차이를 나타냈다.

본 연구의 한계점은 AFB 도말 양성검체와 음성검체의 수집기간에 차이가 있었으며 평가한 검체 수가 AFB 도말 양성검체 102개, 음성검체 177개로 세가지 시약 간의 성능의 우열을 가리기에는 불충분한 수였다. 하지만, 농도가 낮을 것으로 생각되는 검체를 다수 포함하여 비결핵항산균 검출에 대해 결과의 유의한 차이를 나타냈다. 이는 AdvanSure의 경우 제조사에서 제시하는 검출 한계가 1.4 copies/μL이고 주요 비결핵항산균(*M. avium*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*)의 검출한계는 8.5~538.2 copies/μL로 다양하였고, Genedia의 경우는 결핵균 0.2 copies/μL, 비결핵항산균(*M. fortuitum*)은 10 copies/μL로 제시하고 있다. PowerChek의 경우 목표유전자에 대한 최저검출한계만 제시하고 있으며 IS6110과 ITS 모두 2.5 copies/μL로 동일하였다. 세가지 실시간 PCR 시약은 동일한 유전자를 목표로 하였으나 서로 다른 부위를 증폭하며, 시약에 따라 측정한계치의 차이가 있음으로써 검사 성능의 차이를 나타냈다. 앞으로는 검사실에서 새로운 시약 도입 시 이러한 특성을 고려하여 제조사가 제시하는 검출 한계(limit of detection, LOD) 검증(verification)이 각 목표 유전자 혹은 균종별로 필요할 것으로 판단되었다.

핵산증폭검사는 높은 민감도와 특이도에도 불구하고 결핵 균주의 역학적인 특성과 항결핵제 감수성 검사의 필요성 때문에 AFB 도말검사와 배양 검사를 완전히 대체하는 것은 불가능하고 위음성과 위양성의 가능성이 존재하므로 임상양상과 연관지어 결과를 해석해야 한다[23].

결론적으로, 이 연구는 결핵균과 비결핵항산균 검출을 위한 세가지 실시간 중합효소연쇄반응 시약의 진단정확도를 평가하였다. AdvanSure™ TB/NTM real-time PCR kit (LG Chem.)와 Genedia® MTB/NTM detection kit (Green Cross MS), PowerChek™ MTB/NTM Real-time PCR kit (Kogenebiotech)의 세가지 시약의 진단정확도는 결핵균 검출에 대해 동등한 결과를 나타냈으며, 비결핵항산균 검출에 대해서는 차이를 보였다.

요약

배경: 대부분의 국가에서 결핵균(MTB)으로 인한 질병 부담은 계속 감소하고 있지만 비결핵항산균(NTM)으로 인한 질병은 공중보건에 문제가 되고 있다. 본 연구는 결핵균과 비결핵항산균을 검출하는데 있어 AdvanSure TB/NTM real-time PCR kit (AdvanSure; LG Chem., Korea), Genedia MTB/NTM detection kit (Genedia; Green Cross MS, Korea) 및 PowerChek MTB/NTM Real-time PCR kit (PowerChek; Kogenebiotech, Korea) 세가지 실시간 핵산증폭검사 시약의 진단정확도를 비교하고자 하였다.

방법: 고려대학교 구로병원 진단검사의학과에서 2016년 11월부터 2017년 10월까지 접수된 102개의 항산균 도말검사 양성검체와 177개의 음성검체를 대상으로 하였고 Genedia Mycobacteria DNA Prep Kit (Green Cross MS, Korea)를 사용하여 핵산을 추출하였다. 통계분석은 MedCalc 18.11.6 (MedCalc Software, Belgium)을 사용하였다.

결과: 총 279개의 검체 가운데 항산균이 64건, 비결핵항산균이 28건이었다. AdvanSure/Genedia/PowerChek의 결핵균 검출에 대한 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도는 각각 96.9%/95.3%/96.9%, 98.5%/99.5%/98.5%, 58.9%/80.9%/58.9%, 99.9%/99.9%/99.9%였고, 비결핵항산균에서는 각각 81.5%/44.4%/88.9%, 99.6%/100.0%/98.7%, 57.3%/100.0%/32.8%, 99.9%/99.6%/99.9%였다. 비결핵항산균 검출에 대한 AdvanSure와 PowerChek의 ROC 곡선 아래의 면적은 Genedia와 유의하게 차이가 있었다($P < 0.0001$).

결론: 세가지 실시간 PCR은 항상균 도말 양성과 음성 검체에서 결핵균을 검출하는데 신뢰할만한 결과를 보였다. 비결핵항산균 검출의 진단정확도는 세가지 시약간의 차이가 존재하였다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. WHO. Global tuberculosis report 2019. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ [Online] (last visited on 18 November 2019).
2. Yoo JW, Jo KW, Kim MN, Lee SD, Kim WS, Kim DS, et al. Increasing trend of isolation of non-tuberculous mycobacteria in a tertiary university hospital in South Korea. *Tuberc Respir Dis* 2012;72:409-15.
3. Koh WJ, Chang B, Jeong BH, Jeon K, Kim SY, Lee NY, et al. Increasing recovery of nontuberculous mycobacteria from respiratory specimens over a 10-year period in a tertiary referral hospital in South Korea. *Tuberc Respir Dis* 2013;75:199-204.
4. Park YS, Lee CH, Lee SM, Yang SC, Yoo CG, Kim YW, et al. Rapid increase of non-tuberculous mycobacterial lung diseases at a tertiary referral hospital in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:1069-71.
5. Kwon YS and Koh WJ. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease. *J Korean Med Sci* 2016;31:649-59.
6. Ryu YJ, Koh WJ, Daley CL. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: clinicians' perspectives. *Tuberc Respir Dis* 2016;79:74-84.
7. Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al. Official American thoracic society/infectious diseases society of America/centers for disease control and prevention clinical practice guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis* 2017;64:111-5.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:7-10.
9. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective. *J Korean Med Sci* 2005;20:913-25.
10. Choi YJ, Kim HJ, Shin HB, Nam HS, Lee SH, Park JS, et al. Evaluation of peptide nucleic acid probe-based real-time PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. *Ann Lab Med* 2012;32:257-63.
11. Lim JH, Kim CK, Bae MH. Evaluation of the performance of two real-time PCR assays for detecting *Mycobacterium* species. *J Clin Lab Anal* 2019;33:e22645.
12. Choe W, Kim E, Park SY, Chae JD. Performance evaluation of anyplex plus MTB/NTM and AdvanSure TB/NTM for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria. *Ann Clin Microbiol* 2015;18:44-51.
13. American Thoracic Society and Centers for Disease Control. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:725-735.
14. Gaillard T, Fabre M, Martinaud C, Vong R, Brisou P, Soler C. Assessment of the SD bioline Ag MPT64 rapid and the MGIT TBc identification tests for the diagnosis of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:154-6.

15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). User protocol for evaluation of qualitative test performance EP12-A2. Wayne, PA, 2008.
16. Kong KA. Statistical methods: reliability assessment and method comparison. *Ewha Med J* 2017;40:9.
17. Huh HJ, Kwon HJ, Ki CS, Lee NY. Comparison of the Genedia MTB detection kit and the Cobas TaqMan MTB assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2015;53:1012-4.
18. Cho WH, Won EJ, Choi HJ, Kee SJ, Shin JH, Ryang DW, et al. Comparison of AdvanSure TB/NTM PCR and COBAS TaqMan MTB PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in routine clinical practice. *Ann Lab Med* 2015;35:356-61.
19. Kee SJ and Suh SP. Increasing burden of nontuberculous mycobacteria in Korea. *J Korean Med Sci* 2017;32:1215-6.
20. WHO. Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational 'how-to': practical considerations. Geneva; Switzerland: World Health Organization, 2014.
21. Jeong JY, Lee SH, Jang S. A systematic review on the effectiveness of detection of *M. tuberculosis* and rifampin resistance using Xpert MTB/RIF. *Ann Clin Microbiol* 2014;17:42-49.
22. Li S, Liu B, Peng M, Chen M, Yin W, Tang H, et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12:e0180725.
23. Jung CL, Kim M, Seo D, Lee M. Clinical usefulness of real-time PCR and Amplicor MTB PCR assays for diagnosis of tuberculosis. *Korean J Clin Microbiol* 2008;11:29-33.