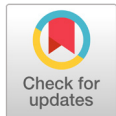


Original Article

결핵균과 비결핵 항산균 검출을 위한 AdvanSure TB/NTM Plus Real-Time PCR의 평가

함초롱^{1,2}, 소민경¹, 정혜선¹, 이미애¹¹이화여자대학교 의과대학 진단검사의학교실, ²이원의료재단Evaluation of the AdvanSure TB/NTM Plus Real-Time PCR Assay for the Simultaneous Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria from Clinical SpecimensChorong Hahm^{1,2}, Min-Kyung So¹, Hae-Sun Chung¹, Miae Lee¹¹Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, ²Eone Laboratories, Seoul, Korea.

OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585
eISSN : 2288-6850Ann Clin Microbiol 2020 March, 23(2): 105-116
<https://doi.org/10.5145/ACM.2020.23.2.7>

Corresponding author

Miae Lee

E-mail: miae@ewha.ac.kr

Tel: +82-2-2650-5287

Fax: +82-2-2650-5091

Received: March 05, 2020

Revised: April 28, 2020

Accepted: May 14, 2020

© 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.

ABSTRACT

Background: The AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR (AdvanSure plus PCR; LG Chem., Korea) assay has been developed to increase the diagnostic sensitivity of nontuberculous mycobacteria (NTM) compared with the currently used the AdvanSure TB/NTM real-time PCR (AdvanSure PCR; LG Chem., Korea) assay. In this study, we aimed to evaluate the performance of the AdvanSure plus PCR comparing the results with mycobacterial culture and the AdvanSure PCR.

Methods: Patients (n=199) with suspected NTM or *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) were tested using AdvanSure plus PCR, AdvanSure PCR, acid-fast bacilli staining, and mycobacteria culture. Additionally, 200 DNA samples (n=100, MTC and n=100, NTM) were obtained from positive MTC or NTM cultures for evaluation using the AdvanSure plus PCR assay.

Results: The two real-time PCR systems showed a 94.0% (n=187/199) concordance rate (Kappa=0.94). Based on culture results, the sensitivity and specificity for the detection of MTC were 100% (45/45) and 83.8% (129/154) using AdvanSure plus PCR, and 100.0% (45/45) and 99.3% (153/154) using AdvanSure PCR, respectively. The sensitivity and specificity for NTM detection were 68.0% (n=17/25) and 90.2% (n=157/174), respectively, with AdvanSure plus PCR, and 64.0% (n=16/25) and 95.4% (n=166/174), respectively, using AdvanSure PCR. With culture-positive samples, AdvanSure plus PCR tested positive for 100% of both the MTC and NTM specimens. Seven (out of 200) culture-positive samples tested positive for both MTC and NTM using the AdvanSure plus PCR.

Conclusion: AdvanSure plus PCR had increased sensitivity but decreased specificity compared with AdvanSure PCR for the detection of NTM. The AdvanSure plus PCR assay can be used for the simultaneous detection of MTC and NTM in direct specimen and culture.

Keywords: *Mycobacterium*, Polymerase chain reaction, Tuberculosis

INTRODUCTION

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)에 의해 일어나는 전염성 질환이다. 결핵균은 폐 이외에도 림프절, 흉막, 골관절, 신장, 뇌막, 복막, 소장, 대장, 난관, 피부 등 모든 장기에 감염되며, 임상 증상이 다양하다. 일반적 증상은 피로, 쇠약, 체중 감소, 발열이며 폐에 감염되면 만성 기침이 있고 병이 더 진행되면 혈담이 관찰된다. 반면 비결핵 항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)은 토양이나 물 등 생활환경에 널리 존재하는 비병원성 균으로 인식되어 왔다[1]. 그러나 1980년대 후천성 면역결핍증이 유행하면서 NTM 유발 질환이 증가하였고, 임상적 중요성에 대한 인식과 배양법의 발달에 따라 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)에 감염되지 않은 환자에서도 폐질환, 궤양성 질환, 염증성 장질환 등을 유발함이 보고 되었다. 국내 보고에 따르면, NTM 유발 폐질환의 유병률이 2007년 인구 10만명당 19.0명에서 2016년에는 39.6명으로 급격히 증가하는 추세이다 [2]. 또한 이들 NTM은 대부분 결핵균 치료제에 저항성을 가지고 있다. 따라서, 우리나라에서도 매년 NTM 유발 질환이 증가함에 따라 결핵균과 NTM을 정확히 구별하는 진단법이 필요하며, 이를 통해 불필요한 치료를 줄이고 균종에 따른 다른 치료법을 적용하고 감염 관리에 소요되는 비용의 낭비를 막을 수 있다[3].

국내 결핵의 유병률은 점차 감소하고 있지만 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 국가들에 비해 여전히 높은 비율이고 2018년 100만명당 51명을 차지하고 있다[4]. 그러므로 결핵을 신속히 진단하고 치료하기 위해 국가적 과제로 노력을 기울이고 있다.

전통적으로 결핵의 진단은 호흡기 검체에서 세균학적으로 증명하는 것으로 환자의 임상증상 확인, 흉부 X-선 촬영, 항산균 도말 검사(acid-fast bacilli smear, AFB smear), 객담의 결핵균 배양, 분자생물학적 검사 등이 행해지고 있다. 이중 항산균 도말 검사가 간단하고 빠른 진단법으로 이용되고 있으나 낮은 민감도와 결핵균과 NTM을 감별하지 못하는 단점이 있다. 결핵균 배양법은 결핵균 확진의 표준진단법이지만 시간이 오래 걸려 6-8주까지 소요되는 단점이 있다[5,6]. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 결핵의 진단에 널리 이용되고 있는데 빠른 시간 내에 검사가 가능하고, 결핵균과 NTM을 구별할 수 있으며, 항산균 도말 검사보다 높은 민감도를 보이는 장점이 있어 유용한 보조 검사로 활용되고 있다[7,8]. 최근에는 전통적 PCR 방법에서 민감도가 높고 재현성이 좋은 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR) 방법이 널리 쓰이고 있다[9-11].

최근 개발된 AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR (AdvanSure plus PCR; LG Chem., Seoul, Korea) 키트는 기존의 AdvanSure TB/NTM real-time PCR (AdvanSure PCR; LG Chem., Seoul, Korea) 키트와 비교해 검출부위를 변경하여 중복 감염 시 소량의 NTM을 검출할 수 있게 하여 NTM 진단의 민감도를 높였다.

이에 본 연구에서는 최근 개발되어 NTM 진단의 민감도를 높아진 AdvanSure plus PCR 키트를 기존의 AdvanSure PCR 키트와 비교하고, 항산균 도말 검사 및 결핵균 배양 결과와 비교 평가하고자 한다.

MATERIALS AND METHODS

1. 연구 대상

2016년 1월부터 2017년 7월까지 다양한 임상 검체(객담 140예, 흉수 17예, 기관흡인액 18예, 농양, 림프절, 조직 17예, 소변 3예, 뇌척수액 2예, 대변 1예, 기타 체액 1예)에서 TB/NTM PCR 검사 가 의뢰되어 -70°C 냉동고에 보관되었던 DNA 검체 199개와 2012년 1월부터 2016년 8월까지 결핵균 배양이 의뢰되어 결핵균 혹은 NTM이 분리되어 -70°C 냉동고에 보관되었던 DNA 검체(결핵균 100균주와 NTM 100균주)를 대상으로 하였다. 본 연구는 이화여자대학교 부속 목동병원 생명윤리위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받았다(IRB No. 2016-12-015-003).

2. 검체 전처리

객담을 포함한 호흡기 검체는 검체와 동량의 4% NaOH/NALC (sodium hydroxide/standard N-acetyl-L-cysteine)를 15 mL의 원심관 튜브(conical tube)에 넣고 볼텍스믹서(vortex mixer)에서 잘 혼합한 다음 15분간 실온 방치 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액은 버리고 남은 침전물을 검사에 사용하였다.

3. 항산균 도말 염색 검사

카르볼푸신(Carbol-fuchsin)을 이용한 질-닐슨(Ziehl-Neelsen) 염색법이나 형광 염색법(Auramine-rhodamine fluorescence)을 이용하여 미국 질병예방통제국(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)의 기준에 따라 판독하였다.

4. 결핵균 배양 검사

전처리를 마친 검체를 각각 고체 배지와 액체 배지에 동시에 배양하였다. 고체 배지 배양은 3% 오가와 배지에 접종하고 37°C에서 8주간 배양하였다. 액체 배지 배양은 BBL MGIT mycobacteria growth indicator tube (Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 접종하여 MGIT 960 (Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA)을 이용하여 6주간 배양하였다. 배양 양성 균주는 MolecuTech MTB-ID (Molecular & Diagnostic Inc., Gangwon, Korea)를 이용한 분자 진단 방법으로 결핵균과 NTM으로 구분하였고, GenoType *Mycobacterium* CM & AS (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)를 이용하여 PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) 방법으로 NTM 균종 동정을 하였다. 모든 방법은 제조사의 지침에 따라 시행하였다.

5. 핵산 추출

전처리 과정 후 남아있는 침전물에 200 µL의 시료 전처리액 2배를 첨가한 후 파이펫을 이용하여 침전물을 섞어준 후 TANBead Optipure viral auto plate (TAN Bead, Taoyuan, Taiwan)를 이용한 탄비드 스마트 랩어시스트-32 (TANBead Smart LabAssist-32 (SLA-32), TAN Bead, Taoyuan, Taiwan)의 자동 핵산 추출시스템을 이용하여 제조사의 지침에 따라 DNA를 추출하였다.

6. AdvanSure TB/NTM real-time PCR

AdvanSure PCR 키트를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 시행하였다. 전처리 과정 후 남아있는 침전물을 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 시료 전처리액2를 1.0 mL 첨가하여 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 이 과정을 2번 반복했다. 추출 버퍼(extraction buffer) 50 μ L를 잘 흔들어 섞은 후 1.5 mL 튜브에 첨가하고 100°C에서 20분간 가열한 다음 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 잘 섞은 후 13,000 rpm에서 다시 3분간 원심분리 후 상층액 5 μ L를 PCR에 사용하였다. 2×PCR mixture가 10 μ L씩 분주되어 있는 200 μ L 튜브에 TB/NTM primer/probe 혼합액 5 μ L와 추출한 DNA 시료 5 μ L 첨가하여 원심분리 한 후 SLAN real-time quantitative PCR detection system (Shanghai Hongshi Medical Technology Co., Ltd, Shanghai, China)을 이용하여 넣어 검사하였다. Ct (threshold cycle)값 35 미만을 양성으로 하여 NTM Ct값에서 TB Ct값을 뺀 값이 0 이상이면 결핵균만 존재하는 경우, 0 미만이면 NTM 중복 감염으로 판정하였다.

7. AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR

최근 개발된 AdvanSure plus PCR 키트는 기존의 AdvanSure PCR 키트와 비교해 NTM의 검출 부위를 internal transcribed spacer (ITS)에서 16S rRNA로 변경하여 중복 감염 시 소량의 NTM을 검출할 수 있게 하여 NTM 진단의 민감도를 높였다.

AdvanSure plus PCR 키트를 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다. 2×PCR mixture가 10 μ L씩 분주되어 있는 200 μ L 튜브에 TB/NTM primer/probe 혼합액 5 μ L와 추출한 DNA 시료 5 μ L 첨가하여 원심분리 한 후 볼텍스믹서나 손가락으로 태핑하여 잘 섞어주었다. 원심분리 후 SLAN real-time quantitative PCR detection system (Shanghai Hongshi Medical Technology Co., Ltd)에 넣어 증폭하여 검사하였다.

PCR 반응의 검출에는 총 3개의 채널(TB, NTM, internal control, 이하 IC)을 이용하였고 각각의 채널에서 FAM, HEX, Cy5 파장의 시그널(signal) 형성을 확인하였다. TB 채널과 IC에서는 Ct값이 35 미만, NTM 채널에서는 40 미만일 때를 양성으로 하였다. TB 채널에서 양성을 보이는 경우를 TB, NTM 채널에서 양성을 보이는 경우 NTM으로 판정하며, TB, NTM 채널에서 동시에 양성을 보이는 경우 중복 감염, IC 채널에서만 양성을 보이는 경우 음성으로 판정하였고, 모든 채널에서 음성을 보이는 경우는 재검사를 실시하였다.

8. 연구결과 비교

임상검체 199개와 균주 200개를 결핵균 배양을 기준으로 하여 결핵균과 NTM 검출에 대한 민감도 특이도를 산출하였다. 임상검체에서 AdvanSure plus PCR의 결과를 기존의 AdvanSure PCR 결과와 비교하여 일치율을 구하여 비교하였다. 결과의 차이가 있는 경우는 재검을 시행하였고 균주에서 AdvanSure plus PCR을 시행한 결과가 배양과 일치하지 않는 검체는 추가적으로 AdvanSure PCR을 시행하였다.

RESULTS

1. 배양된 균주의 *Mycobacterium* 군종 분포

이번 연구에 포함된 *Mycobacterium* 군종 동정 결과는 *M. tuberculosis* complex (MTC) 100주 (50.0%)와 NTM 100주(50.0%)가 포함되었으며, NTM은 *M. intracellulare* 37주(16.4%), *M. avium* spp 28주(12.4%), *M. abscessus* 14주(6.2%), *M. gordonae* 6주(2.7%), *M. fortuitum* 5주(2.2%), *M. kansasii* 4주(1.8%)와 *M. chelonae* 2주(0.9%), *M. heckeshornense* 3주(1.3%), *M. lentiflavum* 1주(0.4%) 였다 (Table 1).

Table 1. Frequency of *Mycobacterium* species in this study

Species	No.	%
MTC	100	50.0
NTM	100	50.0
<i>M. abscessus</i>	14	6.2
<i>M. avium</i> species	28	12.4
<i>M. kansasii</i>	4	1.8
<i>M. intracellulare</i>	37	16.4
<i>M. chelonae</i>	2	0.9
<i>M. fortuitum</i>	5	2.2
<i>M. gordonae</i>	6	2.7
<i>M. heckeshornense</i>	3	1.3
<i>M. lentiflavum</i>	1	0.4
Total	200	100.0

Abbreviation: MTC, *M. tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria.

2. 배양된 균주에서 시행한 AdvanSure plus PCR 결과

AdvanSure plus PCR로 검사한 결과 결핵균 100주와 NTM 100주를 모두 검출하여 검출률은 100%였으나, 결핵균 100주 및 NTM 100주 중 7주에서 결핵균과 NTM 중복 검출로 나타나서 항산균 배양과의 일치율은 96.5% (193/200) 이었다(Table 2, 3). 결핵균 100주에 대한 AdvanSure plus PCR에서 MTC 와 NTM 중복 감염을 보인 3주를 AdvanSure PCR로 검사한 결과 1주만 결핵균과 NTM 혼합으로 나타났으며 2주는 결핵균으로 판독되었다. NTM 100균주 중 AdvanSure plus PCR에서 결핵균과 NTM 혼합을 보인 4주(*M. intracellulare* 1주, *M. kansasii* 1주, *M. gordonae* 2주)를 AdvanSure PCR로 검사한 결과 1주는 AdvanSure PCR에서 NTM으로 나타났고 3주는 결핵균과 NTM 중복 감염으로 판독되었다.

Table 2. Performance of AdvanSure plus PCR in 200 mycobacterial strains.

Culture	AdvanSure plus PCR		
	MTC (n=97)	MTC and NTM (n=7)	NTM (n=96)
MTC	97	3	
NTM		4	96
<i>M. abscessus</i>	0	0	14
<i>M. avium</i>	0	0	28
<i>M. chelonae</i>	0	0	2
<i>M. fortuitum</i>	0	0	5
<i>M. gordonae</i>	0	2	4
<i>M. heckeshornense</i>	0	0	3
<i>M. intracellulare</i>	0	1	36
<i>M. kansasii</i>	0	1	3
<i>M. lentiflavum</i>	0	0	1

Abbreviations: MTC, *M. tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; AdvanSure plus PCR, AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR

Table 3. Results of AdvanSure plus PCR and AdvanSure PCR in 7 cases of MTC and NTM mix

Species	AdvanSure plus PCR				AdvanSure PCR			
	MTC Ct	NTM Ct	IC Ct	Result	MTC Ct	NTM Ct	IC Ct	Result
<i>M. intracellulare</i>	33.57	17.87	24.06	MTC and NTM positive	31.99	18.37	28.92	MTC and NTM positive
<i>M. kansasii</i>	33.32	20.48	24.03	MTC and NTM positive	33.19	22.92	27.76	MTC and NTM positive
<i>M. gordonae</i>	34.66	19.98	24.10	MTC and NTM positive	No Ct	21.16	27.97	NTM positive
<i>M. gordonae</i>	29.15	17.90	23.98	MTC and NTM positive	29.25	19.01	29.39	MTC and NTM positive
MTC	21.16	17.25	24.34	MTC and NTM positive	21.81	18.56	No Ct	MTC and NTM positive
MTC	16.31	25.8	28.02	MTC and NTM positive	16.94	21.88	No Ct	MTC positive
MTC	14.16	19.84	No Ct	MTC and NTM positive	13.71	17.91	No Ct	MTC positive

Abbreviation: Ct, threshold cycle; IC, internal control; MTC, *M. tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; AdvanSure PCR, AdvanSure TB/NTM real-time PCR; AdvanSure plus PCR, AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR.

3. 임상검체에서 시행한 항산성염색, AdvanSure PCR 및 AdvanSure plus PCR의 민감도와 특이도

임상 검체 199예를 항산균 배양 결과를 기준으로 하여 민감도와 특이도를 계산하였다. 결핵균에 대한 민감도는 항산성 염색 51.1% (23/45), AdvanSure PCR 및 AdvanSure plus PCR은 모두 100% (45/45)이었고, 결핵균에 대한 특이도는 항산성 염색 99.3% (153/154), AdvanSure PCR 및 AdvanSure plus PCR 모두 83.8% (129/154) 이었다. NTM에 대한 민감도는 항산성 염색 20.0% (5/25), AdvanSure PCR 64% (16/25) 및 AdvanSure plus PCR 68% (17/25)이었고, NTM에 대한 특이도는 항산성 염색 99.4% (173/174), AdvanSure PCR 95.4% (166/174) 및 AdvanSure plus PCR 90.2% (157/174) 이었다(Table 4, 5).

Table 4. Results of AdvanSure plus PCR, AdvanSure PCR assay and AFB staining according to the results of culture

	Culture		
	MTC (n=45) No. (%)	Negative (n=129) No. (%)	NTM (n=25) No. (%)
AdvanSure PCR			
MTC	45 (100)	25 (19.4)	0
Negative	0	96 (74.4)	9 (36.0)
NTM	0	8 (6.2)	16 (64.0)
AdvanSure Plus PCR			
MTC	42 (93.3)	25 (19.4)	0
MTC and NTM	3 (6.7)	0	0
Negative	0	90 (69.8)	8 (32.0)
NTM	0	14 (10.9)	17 (68.0)
AFB stain			
Negative	22 (48.9)	128 (99.2)	20 (80.0)
Positive	23 (51.1)	1 (0.8)	5 (20.0)

Abbreviation: MTC, *M. tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; AdvanSure PCR, AdvanSure TB/NTM real-time PCR; AdvanSure plus PCR, AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR.

Table 5. The performance of AdvanSure plus PCR, AdvanSure PCR assay, and AFB stain for detection of MTC/NTM compared with mycobacterial culture

	Sensitivity % (No.)	Specificity % (No.)	PPV [§] %	NPV [§] %
AdvanSure PCR				
MTC	100.0 (45/45)	83.8 (129/154) [*]	32.1	100.0
NTM	64.0 (16/25)	95.4 (166/174) [†]		
AdvanSure plus PCR				
MTC	100.0 (45 [‡] /45)	83.8 (129/154) [*]	32.1	100.0
NTM	68.0 (17/25)	90.2 (157/174) [‡]		
AFB staining	40.0 (28/70)	99.2 (128/129)		

^{*}Included negative culture samples (n=129) and NTM positive culture samples (n=25).

[†]Included MTC & NTM co-positive samples (n=3) by AdvanSure plus PCR.

[‡]Included negative culture samples (n=129) and MTC positive culture samples (n=45).

[§]Calculated using Korean tuberculosis prevalence of 0.0768%.

Abbreviation: MTC, *M. tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; AdvanSure PCR, AdvanSure TB/NTM real-time PCR; AdvanSure plus PCR, AdvanSure plus TB/NTM real-time PCR.

4. 임상검체에서 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR의 비교 (Table 6)

임상검체 199예에서 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR의 결과의 일치율은 94.0% (187/199) 이었다(K=0.9478, Standard error 0.01472, 95% CI 0.91855 - 0.97625).

불일치한 12예는 AdvanSure PCR에서 결핵균으로 나왔던 70예 중 3예가 AdvanSure plus PCR에서 결핵균과 NTM 중복 감염으로 나타났으며, AdvanSure PCR에서 NTM로 나왔던 24예 중 1예가 AdvanSure plus PCR에서 음성을 보였다. 또한 AdvanSure plus PCR에서 음성이었던 8예가 AdvanSure plus PCR에서 NTM 양성으로 판독되었다.

Table 6. Concordance of AdvanSure plus PCR, AdvanSure PCR assay for detection of MTC and NTM

		AdvanSure PCR				
		MTC	MTC and NTM	Negative	NTM	Total No.(%)
AdvanSure plus PCR	MTC	67	0	0	0	67 (33.7)
	MTC and NTM	3	0	0	0	3 (1.5)
	Negative	0	0	97	1	98 (49.2)
	NTM	0	0	8	23	31 (15.6)
	Total	70 (35.2)	0	105 (52.8)	24 (12.1)	199 (100.0)

Abbreviation: MTC, *M. tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; AdvanSure PCR, AdvanSure TB/NTM real-time PCR; AdvanSure plus PCR, AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR.

DISCUSSION

결핵을 조기진단하고 치료를 시작하는 것은 공중보건과 의료의 관점에 있어 매우 중요하며, 조기 진단을 위해 PCR을 사용하는 것은 임상 진료의와 환자에게 도움이 된다[11].

AdvanSure plus PCR은 기존의 AdvanSure PCR 키트와 비교해 NTM 검출의 민감도를 높여 개발되었다. 기존 AdvanSure PCR은 결핵균 검출 부위가 IS6110, NTM 검출 부위가 ITS이다. 따라서 결핵균은 IS6110과 ITS를 동시에 보유하고 있어 결핵균 검출 시 결핵균과 NTM의 시그널이 동시에 나타나게 되는데 결핵균은 IS6110이 ITS보다 10배 이상의 카피를 보유함으로 결핵균 및 NTM 채널의 Ct 값을 조합하여 NTM Ct값이 MTC Ct값보다 큰 경우에만 결핵균 및 NTM의 중복 감염으로 판정하게 된다. 그러나 소량의 NTM이 중복 감염된 경우는 결핵균으로 인해 ITS가 검출됨으로 NTM 검출에 어려움이 있을 수 있다. AdvanSure plus PCR은 결핵균 검출 부위는 IS6110으로 동일하나, NTM 검출 부위를 16s rRNA로 변경하여 NTM을 독립적으로 검출함으로써 NTM이 소량 존재하는 결핵균 및 NTM 중복 감염에도 NTM 검출의 가능성을 높였다.

이번 연구에서는 배양된 균주에서 AdvanSure plus PCR을 시행한 결과 결핵균 100주와 NTM 100주를 모두 검출하여 검출률은 100% 이나 결핵균 100주 및 NTM 100주 중 7주에서 결핵균 및 NTM 혼합으로 나타나서 배양과의 일치율은 96.5% (193/200)를 보였다. 결핵균 100균주를 대상으로 한 AdvanSure plus PCR에서 결핵균과 NTM 혼합을 보인 3주를 AdvanSure PCR로 검사한 결과 1주만 결핵균과 NTM 혼합으로 나타났으며 2주는 결핵균으로 나타났는데 이는 두 검사의 판독 기준의 차이에 기인한 것으로 보인다. NTM 100균주 중 AdvanSure plus PCR에서 결핵균과 NTM 혼합을 보인 4주(*M. intracellulare* 1주, *M. kansasii* 1주, *M. goodii* 2주)를 AdvanSure PCR로 검사한 결과 1주는 AdvanSure PCR에서 NTM으로 나타났고 3주는 결핵균 및 NTM 혼합으로 나타났는데, 1주는 AdvanSure plus PCR에서 MTC Ct값이 34.66으로 기준점(cut-off) 근처의 값을 보여 AdvanSure PCR에서 음성으로 나타난 것으로 생각되며, 대부분의 예에서 MTC Ct값이 29.15-33.57로 기준점 값 근처로 나타났다.

본 연구는 배양된 균주에서 추출한 DNA를 보관 후 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR 검사를 하였고 결핵균과 NTM의 감별은 MolecuTech MTC-ID (Molecular & Diagnostic Inc.)를 이용하였다. MolecuTech MTC-ID (Molecular & Diagnostic Inc.)는 IS6110 유전자가 결여된 결핵균이 존재한다는 보고가 증가함에 따라[12,13] 결핵균에만 존재하는 것으로 밝혀진 RD (region of difference) 유

전자를[14] 검출 부위에 추가함으로써 IS6110 유전자를 가지고 있지 않은 결핵균에 의한 음성 결과를 줄이고, 두 개의 유전자를 증폭함으로써 민감도를 높여 AdvanSure PCR 키트와 차이를 보인다. MolecuTech MTC-ID (Molecular & Diagnostic Inc.)를 이용한 연구에 따르면 결핵균과 NTM의 DNA를 각각 다양한 비율로 섞은 후 검사를 시행하였는데, 결핵균과 NTM의 비율이 1:9의 비율로 섞여있을 때도 결핵균을 정확하게 검출할 수 있어 결핵균과 NTM의 DNA가 중복으로 존재하는 경우에도 결핵균 검출에 우수한 성능을 보였다[15]. 또한 이번 실험에서는 NTM이 검출된 경우, 결핵균 특이 밴드가 포함된 GenoType *Mycobacterium* CM & AS (Hain Lifescience GmbH)를 이용하여 NTM 동정을 시행하였고, 여기에서도 결핵균 특이 밴드가 검출된 균주는 모두 제외하였다. 문헌에 따르면 배양된 균주를 이용하여 GenoType *Mycobacterium* CM (Hain Lifescience GmbH)를 DNA 염기서열분석과 비교하였는데 75건의 결핵균 중 74건이 정확히 결핵균으로 동정되었고 1건만 음성을 보여 결핵균 검출에도 민감한 것으로 알려져 있다[16].

결핵균 진단에 있어 핵산 증폭검사의 민감도와 특이도에 대해서 여러 연구가 있어 왔는데, 호흡기 검체를 대상으로 기존 AdvanSure PCR을 평가한 다른 연구에서는 항산균 배양 결과를 기준으로 했을 때 결핵균 검출 민감도와 특이도는 97.3%와 95.5%이며, NTM 검출 민감도와 특이도는 75.0%와 100%로서 민감도는 결핵균보다 낮은 것으로 알려져 있다[17]. 이번 연구에서 임상 검체 199예를 배양 결과를 기준으로 하여 민감도와 특이도에 있어서는 결핵균에 대한 민감도와 특이도는 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR 모두 100% (45/45), 83.8% (129/154)이었다. NTM에 대한 민감도는 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR 각각 64% (16/25) 및 68% (17/25)이었고, NTM에 대한 특이도는 AdvanSure PCR 95.4% (166/174) 및 AdvanSure plus PCR은 90.2% (157/174)이었다. 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 두가지 검사 모두 결핵균에는 높은 민감도를 보였으나 NTM에는 다소 낮은 민감도를 보였다. AdvanSure plus PCR이 기존의 AdvanSure PCR에 비해 NTM 검출에 다소 민감하였으나 특이도는 다소 낮았다.

임상 검체 199예에서 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR의 결과를 비교하면 일치율은 94.0% (187/199)이었다. 불일치한 12예는 AdvanSure PCR에서 결핵균으로 나왔던 70예 중 3예가 AdvanSure plus PCR에서 결핵균과 NTM 혼합으로 나타났는데 이는 배양에서 결핵균인 균주로 NTM에 대한 위양성의 가능성이 있다. AdvanSure PCR에서 NTM로 나왔던 24예 중 1예가 AdvanSure plus PCR에서 음성을 보였는데 이는 배양에서 NTM 음성으로 진음성으로 생각되며 AdvanSure PCR의 결과가 위양성의 가능성이 있다. AdvanSure PCR에서 음성이었던 8예가 AdvanSure plus PCR에서 NTM에서 양성으로 나타났는데 이중 7예는 배양에서 NTM 음성으로 나와서 AdvanSure plus PCR이 위양성의 가능성이 있고, 1예는 배양에서 NTM 양성으로 나와 진양성으로 생각된다. 항산균 PCR 검사의 위양성은 잔효 효과(carry over)나 교차 오염에 의해 발생할 수 있으며, 또한 역학적으로 결핵의 유병률이 높은 지역에서 활동성 결핵이 없는 환자의 검체에서 적은 수의 결핵균이 군체를 형성하여 PCR에 의해 검출될 수 있다[18,19]. 그러나 일부 항결핵제를 투여하여 치료 중인 환자는 배양에서 결핵균 혹은 NTM이 검출되지 않고 PCR에서만 검출되는 경우가 있으며, 발육 조건이 까다로운 NTM의 경우는 배양에서 검출되지 않았을 가능성을 배제할 수는 없다[20,21].

본 연구에 사용된 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR 키트는 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용하기 때문에 증폭 후 전기영동이나 교잡반응과 같은 추가 과정 없이 분석이 가능하므로 핵산 추출 과정에서 검체 오염에 주의하여 교차 오염에 의한 위양성의 가능성을 낮출 수 있다. 또한, 기술적 오류, 균주 수가 적을 때, 결핵균이 응집하거나 끈을 형성하는 성향에 의해 분포가 균일하지 않을 때, 검체에 증폭 과정 저해 인자가 존재할 때, 증폭하는 표적 유전자의 변이나 결핍이 있을 때 위음성을 보일 수 있다[22]. 분자생물학적인 방법은 이러한 위양성이나 위음성의 문제가 존재하기 때문에 항산균 염색과 배양을 함께 사용해야 하며 그 결과는 임상 정보를 고려하여 해석해야 한다.

항산균 도말 검사는 결핵균의 검출을 위해 가장 널리 쓰이는 기본적인 검사이지만, 민감도와 특이도가 낮은 단점을 갖고 있다. 본 연구에서 항산균 도말 검사의 민감도는 51.1%에 불과하여 기존에 보고된 다양한 민감도 52-97%에 비교해 다소 낮았다. 이는 본 연구의 양성 검체 판정이 단순 배양 양성뿐만 아니라 PCR 결과와 다양한 임상 병력을 고려하였기 때문일 것으로 생각된다. 항산균 도말 검사의 특이도는 본 연구에서 99.3%로 기존에 보고된 연구들과 유사하였다.

본 연구의 결과를 요약하면, 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR은 모두 결핵균을 검출하는데 민감도가 매우 높았으나, NTM을 검출함에 있어서는 덜 민감하였다. AdvanSure plus PCR은 NTM의 검출에 AdvanSure PCR보다 민감하여 임상 검체와 배양균주에서 결핵균과 NTM을 동시 검출하는 방법으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

요약

배경: AdvanSure TB/NTM plus real-time PCR (AdvanSure plus PCR; LG Chem., Korea)는 최근에 소개된 분자 진단 방법으로 다양한 검체에서 빠르게 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)과 비결핵 항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)을 동시에 검출할 수 있는 방법이다. AdvanSure plus PCR 검사 키트는 기존의 AdvanSure TB/NTM real-time PCR (AdvanSure PCR; LG Chem., Korea) 검사 키트와 비교하여 검출부위를 변경하여 중복 감염 시 소량의 NTM을 검출할 수 있게 하여 NTM 진단의 민감도를 높여 개발되었다. 이번 연구에서는 AdvanSure plus PCR 검사 키트와 AdvanSure PCR 검사 키트의 성능을 항산균 배양 결과와 비교 및 평가해 보고자 한다.

방법: 총 결핵균 혹은 NTM 감염이 의심되는 환자로부터 얻어진 199개의 임상 검체로 AdvanSure plus PCR, AdvanSure PCR, 항산균 도말 검사, 항산균 배양 검사를 시행하였다. 또한 항산균 배양을 통해 결핵균 혹은 NTM이 동정된 200개의 DNA 검체를 이용하여 AdvanSure plus PCR 키트를 추가적으로 평가하였다. 결핵균 100개와 NTM 100개를 포함하였으며, NTM의 균종은 다음과 같다 (*M. intracellulare* (n=37), *M. avium* (n=28), *M. abscessus* (n=14), *M. goodii* (n=6), *M. fortuitum* (n=5), *M. kansasii* (n=4) 기타 (n=26)). 항산균 배양 결과를 기준으로 하여, AdvanSure plus PCR 키트와 AdvanSure PCR 키트의 민감도와 특이도를 비교하였다.

결과: 실시간 중합효소연쇄반응법 시스템을 이용한 두 방법간의 일치율은 94.0% (187/199)였다 (Kappa=0.94). 항산균 배양 결과를 기준으로 하였을 때, AdvanSure plus PCR 키트의 결핵균 검출에 대한 민감도는 100% (45/45)이고 특이도는 83.8% (129/154)였으며, AdvanSure PCR 키트는 100%

(45/45)와 99.3% (153/154)였다. 또한 NTM 검출에 있어서 AdvanSure plus PCR 키트의 민감도는 68.0% (17/25), 특이도는 90.2% (157/174)이며, AdvanSure PCR 키트는 민감도 64.0% (16/25), 특이도 95.4% (166/174)를 보였다. 배양 양성 검체를 대상으로 했을 때, 100개의 결핵균 검체와 100개의 NTM 검체 모두 각각 AdvanSure plus PCR 키트에서 양성을 보였으며, 이중 7개의 검체는 혼합 양성을 보였다.

결론: 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 AdvanSure PCR과 AdvanSure plus PCR은 모두 결핵균을 검출하는데 민감도가 매우 높았으나, NTM을 검출함에 있어서는 덜 민감하였다. AdvanSure plus PCR의 검출에 AdvanSure PCR보다 민감하여 임상검체와 배양균주에서 결핵균과 NTM을 동시 검출하는 방법으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

CONFLICTS OF INTEREST

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

FUNDING

본 연구는 LG Chem.의 연구비 지원을 받아 수행되었으나 본 연구의 방법 및 결과 등에는 관여하지 않았습니다.

REFERENCES

1. 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.
2. Lee H, Myung W, Koh WJ, Moon SM, Jhun BW. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infection, South Korea, 2007-2016. *Emerg Infect Dis* 2019;25:569-72.
3. Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglione MC. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA* 2005;293:2767-75.
4. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ [online] (last visited on 17 Oct 2019).
5. Levy H, Feldman C, Sacho H, van der Meulen H, Kallenbach J, Koornhof H. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1989;95:1193-7.
6. Ritchie SR, Harrison AC, Vaughan RH, Calder L, Morris AJ. New recommendations for duration of respiratory isolation based on time to detect *Mycobacterium tuberculosis* in liquid culture. *Eur Respir J* 2007;30:501-7.
7. Greco S, Rulli M, Girardi E, Piersimoni C, Saltini C. Diagnostic accuracy of in-house PCR for pulmonary tuberculosis in smear-positive patients: meta-analysis and metaregression. *J Clin Microbiol* 2009;47:569-76.

8. Bartlett JM and Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003;226:3-6.
9. Kim SW, Kim SI, Lee SJ, Lee JH, Ryu YJ, Shim SS, et al. The effectiveness of real-time PCR assay, compared with microbiologic results for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* 2015;78:1-7
10. Drosten C, Panning M, Kramme S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR using pan-mycobacterial primers and a pair of fluorescence resonance energy transfer probes specific for the *M. tuberculosis* complex. *Clin Chem* 2003;49:1659-61.
11. Jung CL, Kim MK, Seo DC, Lee MA. Clinical usefulness of real-time PCR and Amplicor MTC PCR assays for diagnosis of tuberculosis. *Korean J Clin Microbiol* 2008;11:29-33
12. Ho TBL, Robertson BD, Taylor GM, Shaw RJ, Young DB. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals frequent deletions in a 20 kb variable region in clinical isolates. *Int J Genomics* 2000;1:272-82.
13. Talarico S, Durmaz R, Yang Z. Insertion- and deletion-associated genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C-encoding genes among 106 clinical isolates from Turkey. *J Clin Microbiol* 2005;43:533-8.
14. Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999;32:643-55.
15. Wang HY, Jin HW, Bang HE, Choi YI, Park EM, Koh WJ, et al. Evaluation of MolecuTech real MTC-ID for MTC/NTM detection using direct specimens. *Korean J Clin Microbiol* 2011;14:103-9.
16. Mäkinen J, Marjamäki M, Marttila H, Soini H. Evaluation of a novel strip test, GenoType *Mycobacterium* CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:481-3.
17. Hwang S, Oh KJ, Jang IH, Uh Y, Yoon KJ, Kim HY, et al. Evaluation of the diagnostic performance of the AdvanSure TB/NTM real-time PCR kit for detection of mycobacteria. *Korean J Clin Microbiol* 2011;14:55-9.
18. Mdivani N, Li H, Akhalaia M, Gegia M, Goginashvili L, Kernodle DS, et al. Monitoring therapeutic efficacy by real-time detection of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA in sputum. *Clin Chem* 2009;55:1694-700.
19. Rosso F, Michelon CT, Sperhake RD, Verza M, Olival L, Conde MB, et al. Evaluation of real-time PCR of patient pleural effusion for diagnosis of tuberculosis. *BMC Res Notes* 2011;4:279.
20. Thomsen VO, Kok-Jensen A, Buser M, Philippi-Schulz S, Burkardt HJ. Monitoring treatment of patients with pulmonary tuberculosis: can PCR be applied? *J Clin Microbiol* 1999;37:3601-7.
21. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson M, Salfinger M, et al. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2018;31:e00038-17.
22. Min JW, Yoon HI, Park KU, Song JH, Lee CT, Lee JH. Real-time polymerase chain reaction in bronchial aspirate for rapid detection of sputum smear-negative tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:852-8.