



결핵검사지침 II

결핵검사지침 II

머리말

감염병의 적절한 치료 및 관리를 위해서는 정확한 진단이 필수적입니다. 특히, 비말을 통해 전파되는 결핵의 효과적인 치료 및 전파 예방을 위해서는 신속, 정확한 진단이 필수적입니다. 대한임상미생물학회 및 대한진단검사의학회에서는 결핵검사의 질 향상을 위해서 다양한 노력을 기울이고 있으며 그 일환으로 2013년 질병관리본부 국립보건연구원의 지원을 받아 미생물학적 결핵진단법에 대한 표준화된 검사지침을 발간하였습니다. 검사지침을 통해 항산균 도말, 배양 및 감수성검사에 대한 자세한 정보와 지침을 일선 검사실에 제공할 수 있었다고 자평합니다.

이번 2차 지침에서는 1차 지침에서 다루지 않았던 ‘결핵의 분자진단’, ‘잠복결핵감염진단’ 그리고 ‘비결핵 항산균 감염진단’ 이렇게 세 파트로 구성하였습니다. 이는 1) 결핵진단 및 약제 감수성 검사에서 분자유전학적 검사법이 활발하게 이용됨 2) 결핵관리의 영역이 잠복결핵감염으로 확대됨 3) 결핵과의 감별을 요하는 비결핵 항산균 감염이 증가하고 있으나 대부분의 상용화된 검사키트는 결핵진단에 초점이 맞춰져 있는 현실을 반영하여 결정하였습니다.

‘결핵검사지침 II’는 그간 많이 다뤄지지 않았던 새로운 내용을 포함하려고 노력하였고, 집필위원들의 많은 노고가 있었습니다. 그러나, 이런 노력에도 본 지침이 포괄하지 못하는 내용이 있고, 또한 진단법의 지속적인 변화 및 발전이 예상됩니다. 따라서 향후 지속적인 업데이트가 필요할 것입니다.

집필을 위해서 수고해 주신 집필위원들께 다시 한번 깊은 감사를 드리며 이 지침이 국내 결핵관리와 검사의 질 향상에 도움이 되기를 바랍니다.

차례

I. 결핵의 분자진단	1
Molecular diagnosis of tuberculosis	
- 핵산증폭검사(Nucleic acid amplification test)	4
- 신속내성검사(Rapid drug susceptibility testing)	17
II. 잠복결핵감염진단	51
Diagnosis of Latent TB Infection	
- 투베르쿨린 피부반응검사(Tuberculin skin test)	54
- 인터페론감마 분비능 검사(Interferon-gamma release assay)	60
III. 비결핵항산균 감염의 검사실 진단	77
Laboratory Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infection	
- 도말 및 배양검사(Smear microscopy and culture)	81
- 항산균 동정검사(Species identification)	84
- 비결핵항산균 약제감수성검사(Drug susceptibility testing)	107

집필위원 명단

집필위원장

박연준 (가톨릭의대)

I. 결핵의 분자진단

핵산증폭검사

이혁민 (연세의대)

신속내성검사

김자영 (가톨릭관동의대)

II. 잠복결핵감염진단

투베르쿨린 피부반응검사

김창기 (한양의대)

인터페론감마 분비능 검사

기승정 (전남의대)

III. 비결핵항산균 감염의 검사실 진단

도말 및 배양검사 / 항산균 동정검사

신정환 (인제의대)

비결핵항산균 억제감수성검사

성홍섭 (울산의대)

I. 결핵의 분자진단

결핵검사지침 II
Korean Guidelines for Tuberculosis



I. 결핵의 분자진단

지난 수십년간 결핵을 진단하는 과정에 큰 변화가 없었다. 항산균 도말검사와 배양을 이용하여 결핵환자를 발견하고 배양법에 기초한 항결핵제 감수성검사를 시행하여 내성결핵을 진단하고 치료약제를 선정하였다. 이런 전통적인 세균학적 검사법은 오랫동안 사용되어 왔으나 여러 문제점이 지적되었다. 검사법 자체로는 반드시 시행해야 하는 필수 검사임에도 실제 임상진료에 도움이 되지 않거나 오히려 잘못된 결과를 초래하기도 한다. 도말검사의 경우 쉽게 검사가 가능하며 감염성이 높은 호흡기결핵을 신속하게 진단할 수 있는 장점이 있으나 민감도가 낮고 최근 증가하고 있는 비결핵 항산균을 감별할 수 없다. 배양검사는 gold standard 검사이며 감수성검사와 균종동정검사를 위해서 필수적인 검사이지만 결과를 얻기까지 오랜 시간이 소요되어 임상에서 활용도가 높지 않다. 또한 약제감수성검사는 높은 숙련도와 생물안전수준을 요구하기 때문에 제한된 일부 검사실에서만 시행이 가능하다. 따라서 이런 기존 검사법의 한계를 극복하고 신속하고 객관적인 검사에 대한 요구가 꾸준히 있었다.

분자유전학적 검사기법의 도입은 결핵 진단체계에 큰 변화를 가져왔다. 핵산증폭검사는 민감도가 높고 비결핵 항산균을 감별할 수 있으며 신속한 결과 보고가 가능하다. 따라서 핵산증폭검사의 도입을 통해 효율적인 결핵관리가 가능하고 추가적인 결핵전파를 예방할 수 있다. 기존의 감수성검사에 비해 신속내성검사는 보다 안전하고 쉽게 검사가 가능하다. 또한 결과를 얻기까지 수개월을 기다리지 않아도 된다. Xpert MTB/RIF는 더 혁신적인 검사법으로 핵산증폭검사와 신속내성검사를 동시에 시행할 수 있고 특히 검사과정이 매우 단순하고 자동화되어 있는 특징이 있다.

신속 분자검사는 이미 결핵진단의 기본검사로 활용되고 있으며 앞으로 더 많이 이용될 것으로 보인다. 하지만 아직 기존검사법을 대체할 수는 없다는 것이 보편적인 인식이고 해석과 이용에 주의를 요한다. 본 지침에서는 검사술기뿐만 아니라 분자검사의 적절한 활용과 결과해석에 대한 정보를 제공하고자 하였다.

1. 핵산증폭검사 (Nucleic acid amplification test)

연세의대 이 혁 민

핵산증폭검사(NAAT, Nucleic Acid Amplification Test)는 결핵균의 특이 유전자를 증폭하여 그 산물을 검출하는 분자진단학적 검사를 말한다. 핵산증폭검사에서 이용하는 대상 유전자로는 IS6110, RD1 region, *rpoB*, 16S rRNA 등이 있으며, IS6110의 경우 *M. tuberculosis* complex에만 특이적으로 존재하며 한 결핵균에 여러 copy가 있어 결핵균 검출에 흔히 이용된다. 핵산증폭검사는 도말검사보다 민감하고 배양검사보다 신속한 장점이 있어 24-48시간 내에 결과를 알 수 있다. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기법이 많이 이용되고 있으며 일반적으로 높은 특이도를 가지고 있으나 상대적으로 낮은 민감도를 가지고 있다. 항산균 도말 검사와 비교하였을 때 도말 양성검체에서는 높은 양성 예측률(>95%)을 보이나, 도말 음성배양 양성인 검체의 경우 50-80%에서 양성률을 보인다. Amplified mycobacterium tuberculosis direct (MTD) test (Gen-Probe, San diego, CA)와 Amplicor *M. tuberculosis* test (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 등이 임상적으로 결핵이 의심되는 환자의 도말 양성 호흡기계 검체에서 사용이 미국 FDA에서 공인되었으며, 이외에도 In-house PCR method 등 다양한 형태의 검사법이 결핵 진단에 이용되고 있다. 미국 CDC는 결핵이 의심되지만 확진되지 않은 환자에서 호흡기계 검체에서 NAAT를 시행할 것을 추천하고 있으며, 개정된 국내결핵지침에서도 결핵균 핵산 증폭검사를 1) 폐결핵이 의심되나 도말 검사가 음성일 때 혹은 2) 항산균 도말 검사가 양성이지만 비결핵 항산균의 가능성이 있을 때 실시할 것을 추천하였고, 3) 폐외결핵인 경우에도 도움이 된다고 기술하였다. 최근에는 이러한 분자학적 기술의 발달로 진단과 약제감수성 검사를 동시에 시행하게 되었다. Real-time PCR은 기존 PCR과 원리는 비슷하나 증폭 후 작업이 없는 신속하고 객관적인 판정이 가능하며 증폭산물에 의한 오염의 가능성도 낮다. 이러한 장점으로 인해 real-time PCR를 이용한 진단 시약 사용이 증가하고 있다.

핵산증폭검사의 적응증

• 폐결핵

결핵균의 핵산증폭검사는 임상적으로 폐결핵이 의심되지만 객담도말결과가 음성인 환자의 결핵균 감염 여부를 확인하기 위해 사용할 수 있다. 객담 도말검사가 양성일 때에 임상 및 검사 소견에서 비결핵항산균 감염이 의심되는 경우 결핵균 여부를 확인하기 위해 사용할 수 있다. 2014년 개정된 결핵진료지침에서는 폐결핵이 의심될 경우 도말검사 결과에 상관없이 1회 실시할 것을 권고하고 있다.

임상적으로 폐결핵이 의심되어 빠른 진단이 필요한 경우 도말검사가 음성인 환자에서는 보조적인 진단 수단

이 필요하다. 핵산증폭검사는 도말음성인 환자의 객담에서는 배양에 비해 상대적으로 낮은 민감도를 보인다. 도말결과가 음성인 환자에서 핵산증폭검사 결과가 양성이면 결핵을 진단할 수 있지만, 결과가 음성일지라도 폐 결핵을 진단에서 배제할 수는 없다. 결핵이 의심되지 않은 경우는 위양성의 가능성이 있으므로 핵산증폭검사 시행은 권장하지 않으며, 항결핵제를 치료한 환자의 경우도 사멸된 결핵균 핵산이 검출될 가능성이 있어 권장하지 않는다.

• 비결핵항산균 감별

도말검사는 항산균을 모두 검출할 수 있어 결핵균에 특이적인 검사가 아니다. 따라서 도말검사에서도 양성이라도 결핵균 여부에 대한 확인이 필요하다. 통상 배양검사 후에 동정검사를 실시하여 감별할 수 있으나 오래 시간이 소요되므로 항산균 도말양성인 검체를 사용하여 핵산증폭검사를 시행하면 신속하게 결핵균과 비결핵항산균을 감별할 수 있어 유용하다.

• 폐외결핵

폐외결핵의 진단을 위한 핵산증폭검사의 임상적인 유용성은 아직 결론을 내기위한 자료가 충분하지 않다. 폐외결핵이 의심되는 검체에서 핵산증폭검사가 양성인 경우는 결핵을 진단할 수 있지만, 객담을 제외한 흉수, 뇌척수액 및 소변검체 등의 검체에서는 핵산증폭검사가 낮은 민감도를 보이므로 검사결과가 음성이어도 결핵을 배제할 수 없어 주의가 필요하다. 그러나 결핵성수막염 등의 위중한 감염을 빠른 시간내에 진단하기 위해서는 핵산증폭검사가 도움이 될 수 있다.

• 핵산증폭검사의 장점

핵산증폭검사의 가장 큰 장점은 빠른 결과보고이다. 결핵을 조기에 진단함으로써 결핵의 적절한 치료와 감염관리를 수행할 수 있다. 또한 핵산증폭검사는 배양에 비해 민감도가 낮지만 도말검사에 비해서는 높은 민감도를 보이므로 도말음성인 결핵환자를 조기진단할 수 있다는 장점이 있다. 전체 결핵신환의 27%가 도말음성결핵환자를 통해 감염된다는 보고도 있어 결핵이 의심되는 환자에서 핵산증폭검사는 중요한 보조적 진단방법이다.

1. 검사원리

핵산증폭검사는 분자진단검사법 중 가장 흔하게 사용되는 방법으로, 표적핵산자체의 증폭, 탐색자의 증폭 및 발현신호 증폭으로 분류할 수 있다. 결핵균의 진단에는 표적핵산자체를 증폭하는 중합효소 연쇄반응방법이 가장 널리 사용된다. 중합효소 연쇄반응은 열에 의한 DNA 사슬 분리(Denaturation), 시발체(Primer) 결합(Annealing) 및 DNA 합성(Polymerization)의 3가지 주요 단계로 구성되어 있다. 먼저 이중 사슬형태의 DNA에 열을 가하여 단일 사슬로 만든 다음에, 증폭하고자 하는 부위에 해당하는 1쌍의 시발체를 결합시키고, DNA 중합효소를 이용하여 시발체를 기점으로 DNA에 상보적인 염기를 결합시켜 DNA를 합성한다. 합성된 DNA는 다시 열변성을 통해 단일사슬로 분리되고 위의 과정을 반복하게 된다. 이러한 반복과정은 3단계의 온도변화를 통해 이루어지게 되며, 반복적으로 온도를 조절하기 위해서 증폭장비가 필요하다. 반복된 증폭과정을 통해 DNA는 기하급수적으로 증가하며, 30-40회의 반복을 통해 이론적으로 2^{30-40} 배의 DNA가 증폭된다. 증폭된 결핵균의 DNA는 전기영동을 통해서 확인하거나, 최근에는 비특이적 증폭에 의한 위양성을 줄이고 특이도를 높이기 위해 탐색자(Probe)를 붙여서 결핵균을 확인하는 방법을 사용한다.

• 핵산증폭검사의 종류

1) 일반 중합효소 연쇄반응(Conventional PCR)

1985년에 개발된 검사법으로 중합효소 연쇄반응검사법의 가장 기본적인 형태이다. 전형적인 중합효소 연쇄반응을 통해 핵산을 증폭하며, 일반적으로 2,000 bp까지 증폭이 가능하지만 200-500 bp 정도의 크기가 가장 효율적으로 증폭된다. 반응이 끝난 증폭산물은 전기영동장치를 사용하여 증폭여부를 확인한다. 과거 중합효소 연쇄반응검사가 도입되던 초기에 의료기관에서 시발체를 자체 제작하여 시행하던 검사(In house PCR)들이 주로 여기에 해당된다. 증폭산물을 반응튜브에서 꺼내어 전기영동을 시행하므로 고농도의 증폭산물에 의한 검사실오염이 일어날 수 있으므로 주의가 필요하다. 2006년에 보고된 메타분석에 의하면 Cobas Amplicor kit의 민감도와 특이도는 도말양성인 검체에서 96% 및 74%이었고, 도말음성인 검체에서는 64% 및 99.3%이었다.

2) 이중 중합효소 연쇄반응(Nested PCR)

이중 중합효소 연쇄반응은 2쌍의 시발체를 사용하여, 순차적으로 2회의 PCR을 시행하는 것으로 첫 번째 PCR의 증폭산물을 대상으로 2번째 PCR을 시행한다. PCR의 민감도와 특이도를 향상시키기 위해 개발된 방법이지만 첫번째 증폭산물에 의한 위양성이 발생할 가능성이 높아진다는 단점이 있다. 도말양성인 검체를 대상으

로 시행한 2008년 메타분석에서 nested PCR은 0.72의 DOR을 보여 검사수행능력이 real-time PCR (8.85) 등에 비해 매우 낮은 것으로 보고되었다.

표 1. Commercial direct amplification test for MTBC

항목	TMA	PCR	Real-time PCR	SDA
증폭방법	Transcription-mediated	PCR	PCR	Homogeneous strand displacement
증폭대상	RNA	DNA	DNA	DNA
탐색자	16S rRNA	16S rRNA, IS6110, HSP	16S rRNA, IS6110, HSP	IS6110
효소	Reverse transcriptase, T7 RNA polymerase	Taq DNA polymerase	Taq DNA polymerase	BSOB1, EXO-BST
Amplicon containment	Procedural	UNG		Closed microwell
검사시간	3 hours	6 hours	3 hours	3 hours
검체량	450 μ L	100 μ L	100 μ L	500 μ L
검체처리방법	Sonication/Beads	60°C, NaOH, nonionic detergent	60°C, NaOH, nonionic detergent	Heat/sonication
검출법	Hybridization protection/chemiluminescence	Colorimetric	Real-time fluorescence detection	Fluorescent signal

TMA, Transcription-mediated amplification; SDA, Strand displacement amplification

3) 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)

PCR 반응과정에 형광물질을 사용하여 DNA를 증폭시키면서 증폭여부를 동시에 검출할 수 있는 방법이다. 이중 사슬 DNA에 결합하는 SYBR Green I과 시발체 또는 탐색자에 결합하는 다른 형광물질을 사용하여 증폭과정 중에 생기는 형광정도의 변화를 검출한다. 증폭반응이 진행됨에 따라 증폭산물이 증가되고 이와 결합되거나 유리되는 형광물질도 증가하게 된다. 형광이 증가해서 검출되는 첫번째 반응주기를 cycle threshold (C_t)라 정의하고 C_t 주기는 증폭대상이 많을수록 줄어들므로 대상물질의 정량이 가능하다. 하나의 튜브 내에서 증폭과 검출이 이루어지므로 기존 중합효소 연쇄반응에 비하여 검사실오염의 위험성이 적은 장점이 있으며, 검사방법에 따라서 결핵균의 정량과 증폭대상인 유전자의 돌연변이 검출도 가능하다. 단점으로는 형광을 검출할 수 있는 별도의 PCR 전용장비가 필요하며 기존 PCR에 비해 시약이 고가이다. 호흡기검체를 이용한 real-time PCR 검사법의 평가는 다양하게 이루어졌으며, 검사 kit의 종류에 따라 민감도는 79.1-100%, 특이도는 77-100%이며, 도말양성 검체의 민감도는 89.5-100%이었고, 도말음성 검체의 민감도는 71-97.4%이었다(표 2).

표 2. 호흡기검체에서의 real-time PCR 검사의 민감도와 특이도

연도	검체수	양성	검사 kit	민감도	특이도	도말양성 민감도	도말음성 민감도	비교방법	발표논문
2008	-	129	AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Lifescience)	90.7	97.9	100	74.5	Culture	Korean J Lab Med
2008	213	96	AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Lifescience)	95	77	-	-	Culture (Ogawa)	Korean J Clin Microbiol
2010	87	58	Real-Q M. tuberculosis (Biosewoom)	81	-	92.6	71	Culture	Tuber Respir Dis
2011	91	11	COBAS TaqMan MTB (Roche)	100	100	-	-	검사방법간 비교	Yonsei Medical J
2011	91	11	AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Lifescience)	100	100	-	-	검사방법간 비교	Yonsei Medical J
2011	91	11	Real-Q M. tuberculosis (Biosewoom)	100	100	-	-	검사방법간 비교	Yonsei Medical J
2011	635	45	AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Lifescience)	80.9	-	89.5	73.1	Culture (MGIT)	Tuber Respir Dis
2011	-	-	AdvanSure TB/NTM real-time PCR (LG Lifescience)	97.2	-	100	92.8	Culture (MGIT)	Korean J Clin Microbiol
2011	155	59	MolecuTech Real-MTB ID (M&D)	98.3	-	-	-	Culture (MGIT)	Korean J Clin Microbiol
2011	406	24	COBAS TaqMan MTB (Roche)	79.1	95.8	-	-	Culture (MGIT)	J Clin Microbiol
2011	238	134	Arlus M. tuberculosis PCR (Qiagen)	97.8	85.1	-	-	Culture (Bact/Alert)	Int J Tuberc Lung Dis
2011	1,093	141	COBAS TaqMan MTB (Roche)	91.5	98.7	96.9	79.5	Culture (MGIT)	J Clin Microbiol
2011	78	-	Xpert MTB/RIF (Cepheid)	-	-	-	78.2	Culture (MGIT)	J Clin Microbiol
2012	387	253	M. tuberculosis PCR fluorescence (Da An Gene)	99.4	93.1	100	97.4	Culture (MGIT)	J Clin Microbiol
2015	620	32	Genedia MTB detection kit (Green Cross)	81.8	99.8	96.4	99.0	Culture (MGIT)	J Clin Microbiol
2015	620	32	Cobas TaqMan MTB test	78.8	99.5	89.7	98.8	Culture (MGIT)	J Clin Microbiol

4) Xpert MTB/RIF

Xpert MTB/RIF는 real-time PCR 검사법의 일종이지만, 한 개의 검체로도 시약의 손실없이 검사가능하며, 별도의 양성대조와 음성대조가 필요없다는 장점이 있다. 또한 폐쇄형 kit로 오염 및 검사자의 감염 가능성이 낮으며 다제내성을 예측할 수 있는 RIF 감수성검사가 동시에 가능하다는 장점이 있다. 단점으로는 장비와 시약가격이 고가이고 많은 검체를 처리하기 어렵다는 점이다. 2013년부터 건강보험 적용이 되고 있으나 내성결핵 검출 등에 제한적으로 인정되고 있다. Xpert MTB/RIF에 대해서는 감수성시험 분야에 자세히 설명되어 있다.

5) 등온증폭법(Isothermal amplification)

등온증폭은 결핵균검사를 위해 최근에 사용되기 시작한 방법으로 기존의 중합효소 연쇄반응과 유사하지만, 3가지의 단계를 걸친 핵산의 증폭이 아닌 일정한 온도에서 핵산을 증폭하는 점이 다른 특징이다. 단계적인 온도 변화가 필요없으므로 핵산증폭을 위한 고가의 장비가 필요하지 않고 저렴한 항온수조 등에서 증폭이 가능하다는 점이 장점이다. 또한 IS6110을 대상으로 증폭을 시행하면 기존의 PCR에비해서 20배 이상 민감하게 결핵을 진단할 수 있다는 보고가있다(Microbiol Research 2010;165:211-20). 하지만 아직 임상검체를 사용한 연구가 적어 임상적인 의의를 평가할 수 없다는 것이 단점이다.

2. 검체

- 객담 등 호흡기검체
- 체액
- 조직 및 생검검체

3. 장비 및 기구

- PCR 증폭기
- Micropipette
- 원심분리기

4. 시약 및 재료

1) 검사시약 포함 재료 (시약 설명서 참조)

- 검체 희석용 버퍼 (Specimen dilution buffer)
- 증폭용 시약 (Amplification reagent)
- 재생용 버퍼 (Reconstruction buffer)
- 용해용 튜브 (Lysing tube)
- 유성분 시약 (Oil reagent)
- 효소 시약 (Enzyme reagent)
- 효소 희석용 버퍼 (Enzyme dilution buffer)
- 검사종결 시약 (Termination reagent)
- 탐색 양성 대조 (Hybridization positive control)
- 탐색 음성 대조 (Hybridization negative control)
- 탐색자 시약 (Probe reagent)
- 탐색 버퍼 (Hybridization buffer)
- 선택 시약 (Selection buffer)
- 봉합용 카드 (Sealing cards)

2) 검사시약 비포함 재료 (시약 설명서 참조)

- 발색탐지자 (Luminometer)
- 초음파 분쇄자 (Sonicator)
- 검출시약 키트 (Detection reagent kit)
- 건조기 (Dry-heat bath, $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- 초음파 분쇄용 랙 (Sonicator rack)
- 소수성 파이펫 팁 (Pipette tip with hydrophobic plug)
- 폴리프로필렌 튜브 (Polypropylene tube, 12-75mm)
- 마이크로파이펫 (Micropipette)

- 폴리프로필렌 마개 (Snap-top polypropylene cap)
- 온수조 (Water bath, $42^{\circ}\text{C} \pm ^{\circ}\text{C}$, $60^{\circ}\text{C} \pm ^{\circ}\text{C}$)
- 혼합기 (Vortex mixer)
- 무균수 (Sterile water)
- 배양 용기 (Culture tube)
- 유리 비드 (Glass bead)
- 마개 있는원심분리용 튜브 (Screw-cap microcentrifuge tube)
- 양성 대조 균주 (*M. tuberculosis* ATCC25177 또는 ATCC27294)
- 음성 대조 균주 (*M. goodii* ATCC14470 또는 *M. terrae* ATCC15755)
- 염소 소독제 (Bleach, 5.25% hypochlorite solution)
- 벤치 마개 (Plastic backed bench cover)

5. 검사방법

핵산증폭검사를 위해서는 의료기관에서 자체 제작한 시약 (In-house 또는 home-brew) 보다는 상품화된 제품이 여러가지 측면에서 장점을 가진다. 자체시약은 비표준화(Nonstandardized)로 인해 정도관리와 검사수행에 문제가 생길 수 있고, 특히 위양성이 77%까지 증가할 수 있어서 주의가 필요하다.

• 검체의 처리

결핵균의 검출을 위해서는 전처리와 농축이 끝난 검체를 이용하여야 하며 오염에 의한 위양성을 방지하여야 한다. 증폭된 산물에 의한 교차오염(Cross contamination)을 예방하기 위해 핵산증폭검사의 업무흐름은 시약을 준비하는 증폭 전단계의 청결한(Clean) 구역으로부터 검체를 처리하고 결과를 확인하는 증폭후의 오염된(Dirty) 구역으로 한 방향으로만(Unidirectional) 진행되도록 짜여야 한다. 핵산오염에 의한 위양성을 방지하기 위해 핵산증폭검사를 위해 각각의 단계에서 사용하도록 규정된 시약과 장비는 배정된 구역 밖에서 사용해서는 안 된다. Aerosol에 의한 오염을 최소화하기 위해서 모든 숟기는 한 번에 하나의 튜브만을 열어서 검사를 수행한다. 검사에 사용되는 튜브는 똑딱이로 닫을 수 있는 튜브(Snap-cap) 보다는 돌려서 여닫는 마개를 가진 튜브(Screw cap)가 권장된다. 작업을 하는 공간의 표면은 염소계 소독액을 사용하여 소독한다. Real-time PCR 같은 폐쇄형 시스템이나 자동화 시스템을 사용하면 오염에 의한 문제를 예방하는데 도움이 된다. 모든 핵산증폭검사에서의 증폭산물에 의한 오염은 반드시 평가되어야 한다. 매주 또는 매월마다 작업환경을 먼봉으로 문질러 증폭산물에 의한 오염이

있는지 확인하여야 한다. 작업환경이 증폭산물에 의해 오염이 되었으면, 염소계 소독액을 사용하여 15분 정도 표면을 소독하고 deionized water나 70% 에탄올로 닦아낸다. 위의 과정을 표면 오염이 없어질 때까지 반복한다.

일반적으로 객담의 전처리는 배양을 위해 NALC-NaOH 법이 주로 사용되었으나 최근에는 핵산증폭 검사법이 널리 사용됨에 따라 배양과 PCR 검사를 동시에 시행하는 데 적합한 universal sample processing법 (USP법)도 사용되고 있다. USP법은 NaOH를 사용하지 않으므로 전처리 후 검체의 pH를 중성으로 유지할 수 있고, 억제 물질에 의한 핵산증폭검사의 위음성을 줄일 수 있는 장점이 있다. 그러나 최근의 보고에 의하면 기존의 NALC-NaOH 전처리 방법에 비해 USP전처리법이 핵산증폭검사에서 더 나은 결과를 보이지 않는다는 보고도 있고, 일부에서는 NALC-NaOH에 비해 배양 양성률이 낮다는 결과도 보고되어 (58% vs. 43%) 전처리비용이나 처리법의 단점으로 인해 기존의 방법을 대체하여 USP법을 사용할 필요는 없을 것으로 보인다.

[Universal sample processing 법]

- 4-6 M guanidinium hydrochloride (GuHCl), 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 0.5% sarkosyl 및 0.1-0.2 M β -mercaptoethanol을 이용하여 USP 용액을 제조한다
- 검체와 검체량의 1.5-2배의 USP 용액을 혼합한다.
- 혼합물을 진탕한 후 5-10분간 실온에 방치한다
- 10-15 mL 멸균된 3차 증류수를 추가한다
- 실온에서 5,000×g로 10-15분간 원심분리한다
- 상층액은 조심스럽게 버리고, 이때 침전물의 양이 원래의 객담 양의 5-10% 정도로 감소되지 않는 경우에는 다시 2-5 mL USP 용액을 첨가한 후 원심분리를 반복한다
- 멸균된 3차 증류수로 세척하고 남은 침전물로 검사를 시행한다.

• DNA 추출

핵산증폭을 위해서 DNA 추출 과정이 매우 중요하다. 지금까지 여러 DNA 추출방법이 사용되어 왔는데 방법에 따라 결과가 상이하므로 주의를 요한다. 일반적으로 상품화된 kit를 이용할 경우 DNA의 purity가 높아져 inhibition이 줄어드는 효과를 볼 수 있다. 반면 bead beating법이나 boiling법 같은 수기방법은 저렴하고 간편한 장점이 있지만 purity가 상대적으로 낮다. 또한 단순 boiling법의 경우 DNA 추출률이 다른 방법에 비해 떨어지므로 임상검체보다는 배양균주에 적용하는 것이 권장된다. Enzyme법과 bead beating을 함께 적용하면 DNA 추출이 우수하였으며 상용방법 중에서는 magnetic bead를 이용한 경우 더 효율적으로 DNA를 추출하였다는 보고가 있다.

6. 결과해석 및 보고

핵산증폭검사 결과는 아래와 같이 임상 의사에게 보고한다.

1) 양성

검사 결과가 양성으로 나온 경우는 “결핵균 (*M. tuberculosis* complex)의 DNA가 검출되었습니다. 진행 중인 배양 결과를 참고하시기 바랍니다.”

2) 음성

음성인 경우는 다음과 같이 보고한다. “결핵균 (*M. tuberculosis* complex)의 DNA가 검출되지 않았습니다. 결핵균의 DNA 양이 적거나 검체에 존재하는 억제물질에 의해 위음성을 보일 수 있습니다. 진행 중인 배양 결과를 참고하시기 바랍니다”

3) Nontuberculous mycobacteria 양성

Nontuberculous mycobacteria (NTM) 양성인 경우는 다음과 같이 보고한다. “결핵균 (*M. tuberculosis* complex)의 DNA가 검출되지 않았으나 비결핵 항산균의 DNA가 검출되었습니다. 결핵균의 DNA 양이 적어 위음성을 보일 수 있으니 진행 중인 배양 결과를 참고하시기 바랍니다”

결과는 표 3을 참고하여 해석한다. 핵산증폭검사와 도말검사에서 모두 양성이면 결핵균으로 간주할 수 있다. 따라서 격리나 항결핵제 치료를 실시하면 된다. 핵산증폭검사에서는 양성이나 도말검사의 음성인 경우 민감도 차이에 따른 결과로 판단하면 결핵 가능성이 높다. 경우에 따라서는 임상적인 판단을 고려하여 치료와 격리 여부를 결정할 수 있다. 핵산증폭검사에서 음성이고 도말검사에서 양성인 경우 비결핵 항산균을 의심해야 한다. 그러나 이 결과만으로 결핵균을 배제할 수 없다. 도말양성 결핵은 전염력이 높으므로 다른 검체로 검사를 재검하는 것이 좋다. 핵산증폭검사와 도말검사가 모두 음성이더라도 결핵을 배제할 수 없다. 배양검사가 두 검사보다 민감도가 더 높다. 임상적인 판단에 따라 추가검사를 시행할 수 있으며 결핵가능성이 높지 않은 경우 접촉자 조사를 유보하고 격리해제할 수 있다. 이상의 모든 경우에서 반드시 배양검사 결과를 확인하여 최종 판단을 내리는 것이 중요하다. 핵산증폭검사 과정 중에 반응이 억제될 수 있는데 이 경우 다른 검체로 검사한다.

표 3. 핵산증폭검사 결과해석

핵산증폭검사	도말검사	해석
양성	양성	결핵균으로 간주함. 결핵치료를 시작하고 접촉자조사를 실시함. 배양검사 결과를 확인함.
양성	음성	결핵 가능성이 높음. 다른 검체로 핵산증폭검사를 시행하는 것을 고려함. 임상적인 판단을 통해 항결핵제 치료와 접촉자조사 여부를 결정함. 배양검사 결과를 확인함.
음성	양성	비결핵 항산균이 의심됨. 결핵균을 배제하는 결과는 아님 치료와 접촉자조사를 연기할 것을 고려함. 다른 검체로 핵산증폭검사를 시행하는 것을 고려함. 배양검사 결과를 확인함.
음성	음성	검사결과만으로 결핵균을 배제할 수 없음. 추가검사 실시 여부는 임상적 판단에 따라 결정함. 결핵이 강력하게 의심되지 않거나 고위험 상황이 아닌 경우 2번의 도말검사와 핵산증폭검사에서 음성이면 접촉자조사를 유보하고 격리해제함. 다른 검체로 핵산증폭검사를 시행하는 것을 고려함. 배양검사 결과를 확인함.
반응억제	해당사항 없음	증폭과정이 억제되었음. 다른 검체로 검사를 시행함.

4) 위양성과 위음성

핵산증폭검사에서도 위양성과 위음성이 모두 문제가 될 수 있다. 핵산증폭검사의 위양성은 동일한 DNA를 지속적으로 증폭하는 임상검사실의 오염 때문에 주로 발생하며, 결핵균검사에서는 환경에서 오염된 비결핵 항산균의 DNA가 검체를 오염시킨 후에 시발체와 비특이적인 결합을 하여 위양성을 일으키기도 한다. 위음성은 주로 PCR 반응이 최적화되지 못해서 생기는 것과 핵산증폭반응을 억제하는 물질(inhibitor)이 검체내에 포함되어 있는 경우가 대부분이다. 억제물질이 포함되어 있는 지를 확인하기 위해서는 증폭반응을 확인할 수 있는 대조물질이 함께 시험되어야 한다. 핵산증폭검사의 위양성과 위음성은 모두 큰 문제가 될 수 있으므로 진단검사를 위한 PCR 검사는 검체, 장비 및 검사실 측면에서 최적의 조건을 갖추고 안정성이 확보된 상품화된 시약을 사용하는 것이 바람직하다.

7. 정도관리

분자생물학검사는 검사키트(kit)의 제조자에 따라 나눌 수 있는데, 상용화된 방법과 각 검사실에서 직접검사를 위한 키트를 만들어 사용하는 방법이 있다. 검사실에서 직접검사를 위해 제조한 키트는 표준화가 되지 않았으므로 진단을 위한 목적으로 사용하지 않아야 한다. 또한 검사를 처음 시작할 때 만족할 만한 진단 능력을 보인 검사 kit라도 검체나 환자군이 바뀔에 따라 검사 능력이 달라질 수 있어 일정한 시간 간격으로 검사의 양성률을 확인할 필요가 있다.

내부정도관리를 위해서 음성대조군(negative control)과 양성대조군(positive control) 사용이 권장된다. Blank control은 buffer나 수송배지를 이용하는데 DNA 오염여부를 확인하기 위해서 이용된다. Negative control은 검출하고자 하는 DNA sequence를 제외한 핵산을 포함한 검체이다. DNA 추출을 평가하기 위해서 비결핵 항산균을 이용할 수 있다. Negative control로 검사하였을 때 정상적으로 음성결과가 나오면 target sequence가 없는 상태에서 비특이적인 priming이나 반응 등으로 인한 신호가 검출되지 않았음을 확인할 수 있다. Negative control로는 결핵균 음성인 환자 검체, 검출 대상균이 포함되지 않은 검체 혹은 non-target DNA를 이용한다. Positive control은 검사전체를 평가하거나 DNA 증폭과 검출을 평가할 목적으로 사용된다. 검사전체를 평가하기 위한 positive control은 target DNA를 포함하여 임상검체와 유사하게 제조되어야 하며 환자검체와 함께 검사를 시행한다. 증폭과 검출 과정을 평가하기 위한 positive control은 purified target DNA를 검출 한계에 가까운 농도로 첨가하여 제조하며 검체 전처리나 DNA 추출과정을 거치지 않고 검사한다. 비전염성 DNA plasmid나 결핵균에서 추출한 genomic DNA를 이용할 수 있다. 대한임상정도관리협회와 미국 CAP 등의 숙련도 평가 프로그램에서 결핵균 핵산증폭검사 외부정도관리를 실시하고 있으므로 임상검사실은 해당 프로그램에 참여해야 한다.

8. 제한점 및 문제해결

핵산증폭검사는 검사방법, 검체의 종류, 검체의 질, 검체의 양, 검체내의 결핵균의 수 및 도말검사 결과 등에 의해서 결과에 영향을 받는다. 오염에 의한 위양성을 방지하기 위해 검사실의 정확하고 세심한 환경소독이 필요하다. 그리고 도말음성환자의 검체의 검사에 필요한 결핵균의 수가 적어 비교적 낮은 민감도를 보일 수 있다. 결핵이 의심되는 환자에서 검체내의 낮은 결핵균 숫자로 인해 핵산증폭검사가 음성인 경우는 복수의 검체를 시험함으로써 민감도를 올릴 수 있다.

결핵균검사를 위한 핵산증폭검사는 검체와 전처리과정에 사용되는 시약 등에 의해 핵산증폭과정이 억제되

어, 핵산추출법이나 검사방법에 따라 1% 미만에서 10% 이상까지 위음성을 보일 수 있다. 억제물질의 분포는 검체에 따라 다르며, 2011년 윤 등이 보고한 바에 의하면 980검체의 핵산증폭검사서 억제물질에 의한 위음성 비율은 호흡기검체 3.2%, 흉막액 8.9% 및 요검체 6.8%이었다. 따라서 결핵균검출을 위한 핵산증폭검사는 억제물질에 의한 위음성을 확인할 수 있는 내부정도관리물질을 포함하여 시행되어야 하며, 증폭반응억제에 의한 위음성은 억제제를 제거하는 추가적인 과정을 거친 후 재검사하여야 한다. 최근 판매되는 상품화된 핵산증폭검사용 kit는 억제물질에 의한 위음성을 확인할 수 있는 내부정도관리물질을 포함하고 있다. 억제물질을 제거하는 방법에는 검체희석, silica membrane을 사용한 제거, bovine serum albumin (BSA) 첨가, 반복적인 냉동 및 해동과 중탕 등의 방법이 있다. COBAS TaqMan MTB 검사를 위해 억제물질 제거방법을 비교한 연구에서 1:10 희석법이 가장 좋은 억제물질제거율을 보여 주었고(75%), 다른 방법의 억제물질제거 정도는 BSA 첨가, 67.5%; 중탕, 62.5% 및 silica membrane, 30%이었다. 특히 희석과 BSA 첨가를 병행하는 경우 82.5%에서 억제물질에 의한 영향을 제거할 수 있었다.

결핵균검출을 위해서는 16S rRNA, IS6110, hsp 등의 다양한 유전자에 대한 primer가 사용된다. IS6110은 최근에 많이 사용되는 증폭대상이지만 1-4%의 결핵균에서는 IS6110 유전자가 없으며, 일부 국가에서는 IS6110 유전자가 없는 결핵균의 비율이 높은 것으로 보고되어 있다.

9. 참고문헌

- 1) CDC. Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis. MMWR 2009;58:8-10
- 2) 결핵의 새로운 진단법. 대한내과학회지: 제 82 권 제 3 호 2012
- 3) 결핵진료지침 2014 질병관리본부

2. 항결핵제 신속내성검사

가톨릭관동대 김 자 영

항결핵제 신속내성검사는 결핵균에만 특이하게 존재하는 각 약제에 대한 내성유전자들을 분자진단적인 방법으로 확인함으로써 전통적인 약제 감수성검사에 비해 항결핵제 내성을 신속하게 검출할 수 있다. 현재 리팜핀과 이소니아지드 내성 검출에 주로 이용되나, 최근 들어 ethambutol, pyrazinamide, fluoroquinolone 및 2차 항결핵제 주사제에 대한 신속내성검사도 소개되고 있다. 2014년 개정된 결핵 진료지침에 의하면 재치료 등 다제내성 결핵이 의심되는 경우 도말 양성 검체 혹은 배양된 결핵균주를 대상으로 리팜핀 또는 리팜핀과 이소니아지드에 대한 신속내성검사를 시행하는 것을 권고한다(IIA).

항결핵제에 대한 내성은 주로 약제와 관련된 특정 유전자 부위의 변이와 관련되어 있다(표1). 특히 리팜핀 내성의 95%가 *rpoB* 유전자의 코돈 507-533번의 “hot spot” 부위인 81bp 지역에 집중되어있고, 코돈 531 부위에서는 리파부틴과의 교차내성도 보이며, 피라진아미드 내성 균주의 95%가 *pncA* 유전자에서 돌연변이가 발생한다. 반면, 이소니아지드 내성의 경우, *katG* (50-95%), *inhA* (20-35%), *ahpC* (10-15%) 등을 포함한 여러 유전자들의 다양한 부위에서 변이가 발생한다(표2)

신속내성검사법으로는 line probe assay, real-time PCR, 유전자 염기서열분석법, single strand conformation polymorphism, dideoxy fingerprint, PCR-enzyme linked immunosorbant assay, mismatch RNA/RNA protection assay, 바이오칩을 이용한 microarray 등이 있다. 그 중 표준검사법은 유전자 염기서열분석법이며 현재 국내에서는 상품화된 신속내성검사인 고체상 교잡법을 이용한 line probe assay와 real-time PCR 법의 사용빈도가 높다. 리팜핀 내성 검사는 도말 양성 호흡기 검체나 배양 균주 대상으로는 검사 민감도(>95%)와 특이도(~100%)가 모두 높지만, 도말 음성 검체를 직접 이용할 경우에는 이 보다 낮아진다. 또한, 이소니아지드 내성 검출시 리팜핀 내성보다 검사 민감도와 특이도가 낮는데, 이는 이소니아지드 내성에는 *katG*, *inhA* 유전자 이외에도 *ahpC*, *kasA*, *ndh* 등 다양한 유전자가 관여되지만, 현재 사용 중인 시약들은 이들 유전자 중 일부만을 대상으로 검사하기 때문이다(표 3).

현재 배양법이 표준법으로 신속내성검사는 다제내성이 의심되거나 재치료 환자에서 신속내성검사가 우선적으로 시행되는 것이 바람직하며, 결과 보고시 1) 영향을 받는 핵산 및 아미노산, 2) 분석 한계 (검출 한계), 3) 해석시 한계점(interpretative limitations) (예: 음성/변이형이 발견되지 않았다고 해서 약제내성을 완전히 배제할 수는 없다 등)이 포함되어야 한다. 유전자 변이에 따른 약제내성 정도와 교차내성 패턴의 차이를 해석적 보고(interpretative reporting)로 추가하면 진료에 도움이 될 수 있으며 전통적인 배양법 간의 결과 불일치를 보이는 경우에는 아래의 사항을 고려하여야 한다.

표 1. Important genes of *M. tuberculosis* conferring resistance to anti-tuberculosis drugs

Drugs	Gene target	Gene function	Relative frequency in resistant strains	Level of resistance
RIF	<i>rpoB</i>	β -Subunit of RNA-Polymerase	>90%	High
INH	<i>KatG</i>	Catalase-Peroxidase	50–95%	High
	<i>inhA</i>	Enoyl-ACP-Reductase	6–30%	Low
	<i>ahpC</i>	Alkyl-Hydroxid-Peroxidase-Reductase	1–24%	Low
PZA	<i>pncA</i>	Pyrazinamidase	62–97%	High
EMB	<i>embB</i>	Arabinosyl-transferase	47–89%	High
	<i>embA</i>	Arabinosyl-transferase		High
	<i>iniA</i>	Isoniazid-inducible gene		High
SM	<i>rpsL</i>	Ribosomal Protein S12	40–95%	High
	<i>rrs</i>	16S rRNA	20–30%	Low
FQ	<i>gyrA</i>	A subunit of DNA gyrase	80–90%	High
	<i>gyrB</i>	B subunit of DNA gyrase		High
KAN/AMK	<i>rrs</i>	16S rRNA	70%	High
CAP/ VIO	<i>rrs</i>	16S rRNA		High
	<i>tlyA</i>	Cytotoxin/haemolysin homologue		High

RIF, rifampicin; INH, isoniazid; ETH, ethionamide; PZA, pyrazinamide; EMB, ethambutol; SM, streptomycin; FQs, fluoroquinolones, (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin); KAN, kanamycin; AMI, amikacin; CAP, capreomycin; VIO, viomycin; Nuclotide, Nt.

표 2. Frequency of *rpoB*, *katG*, *inhA* and *ahpC* gene mutations associated with RIF and INH resistance in Korea

Rifampicin			Isoniazid		
Mutation type	Relative frequency*	Level of resistance	Mutation type	Relative frequency*	Level of resistance
Ser531Leu	45.8–64.4%	High	<i>katG</i> S315T	55.2–60.3%	High
Asp516Val	8.3–15.4%	High	<i>inhA</i> C–15T	15.8–31.3%	Low
His526Tyr	8.9–13.3%	High	<i>katG</i> S315N	0.8–2.8%	High
His526Arg	0–7.7%	High	<i>ahpC</i> **	3–19%	S to low R
Asp516Tyr	1.9–5.1%	S to high R*	<i>inhA</i> T–8A	0–1.9%	Low
Gln513Lys	1.1–4.4%	Low			
His526Asp	0–4.2%	High			
Leu533Pro	0.8–2.6%	Low			
Ser522Leu	0–2.6%	Low			
His526Asn	0–2.2%	High			
Asp516Asn	0–2.2%	Low			
Ler511Pro	0–1.5%	Low			
Gln513Leu	0–1.1%	Low			

Abbreviations: R, resistant; S, susceptible

* Relative frequency in resistant strains

***ahpC*–9, 10, 12, 9, 46

codon 531, 526, 512 : Rifabutin과 교차 내성 보임, *inhA* C–15T: INH와 ethambutol 교차내성

표 3. Sensitivity and specificity among molecular detection methods of MDR-TB

Method	Manufactures	Drugs			
		Rifampicin		Isoniazid	
		Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
Line probe assay					
INNO-LiPA Rif	Innogenetics (Belgium)	80–100% (> 95%)	99–100%		
GenoType MTBDR	Hain (Germany)	93.5–100%	98.7–99.2%	66(Jap)–92% (Ger) 72–87%(Kor)	99.5–100%
AdvenSure	LG lifescience (Korea)	84.6–94.7%	99.2%	79.7–80%	98.7–99.2%
Real-time PCR					
Xpert MTB/RIF	Cepheid (USA)	98–100% (Smear +) 71.7–84.6%(smear –)	100 % (smear +), 98–99.2% (smear –)		
Microarray					
TB-Biochip	Engelhardt Inc. (Russia)	80%			
DNA chip	Gumma Univ.(Japan)	97%	95%	60%	95%
Sequencing					
Sequencing	GreenCross (Korea)	93.3–93.9%	100%	82.5–89.5%	96–100%
Pyrosequencing	Biotage AB (Sweden)	97.4%	100%	66.7%	100%

• Very major error (배양법 내성, 신속내성검사 감수성)

- 해당 내성 유전형을 검출할 수 있는 내성 탐식자(probe)가 없는 경우
- 유전자 변이 부위가 해당 probe의 검출 범위 이외에 존재
- 해당 probe의 검출 민감도가 낮은 경우
 - 내성 변이 유전자의 염기서열 주변의 Tm(melting temperature)값이 높아 야생형 밴드가 소실될 정도의 단일 nucleotide 변이를 검출하지 못하는 경우
- 배양 검사 시 약제 함유배지에 과도하게 접종(over-seeding)되어 배양 검사가 내성으로 나온 경우
- 비결핵항산균이 자란 경우

• Major error (배양법 감수성, 신속내성검사 내성)

- 침묵 돌연변이(Silent mutation): 아미노산 변이가 없는 돌연변이
- 불균질 내성(Hetero-resistance): 약물 치료 동안 동일 클론의 일부가 내성을 획득해서 내성균주와 감수성 균주가 동시에 존재하는 경우
- 혼합감염(mixed infection): 감수성균주와 내성균주가 같이 감염된 경우(co-infection with different strains)
 - 내성 균주는 감수성 균주보다 느리게 증식되며 액체배지에서 더 뚜렷하게 나타난다(액체배지 > LJ media > Middlebrook 7H11 agar). 따라서 내성균주와 감수성 균주가 같이 있을 때 액체배지에서 자란 균액만을 사용하여 약제 배지에 접종하면 내성 균주가 충분히 발육되지 않아 위감수성으로 판독될 수 있음.
- 저도내성
 - 통상적인 내성기준농도(각각 RIF 40 μ g/mL, INH 0.2 μ g/mL)이하에서 자라는 정도의 내성을 가진 결핵균
- 검체의 교차오염: 검체 조작 중 양성 검체와의 교차 오염
- 비특이적 반응
- Wrong breakpoint in phenotypic methods
 - 배양검사 대상 약제의 감수성 균주와 내성 균주간에 MIC 차이가 크지 않아 통상배양검사의 변별력이 높지 않은 경우
- 약제 배지의 항결핵제 변성

참고문헌

- 1) 결핵진료지침(개정판). 결핵 진료지침 개정위원회, 대한결핵 및 호흡기학회, 질병관리본부, 2014
- 2) Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR 2009;58:7-10.
- 3) World Health Organization. 2008. Interim policy guidance on drug susceptibility testing (DST) of second-line anti-tuberculosis drugs. Geneva. WHO/HTM/TB/2008.392.
- 4) Agreement of drug resistant tuberculosis: emergency update 2008. WHO/HTM/TB /2008.402. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- 5) Pym, A. S., and S. T. Cole. 2002. Drug resistance and tuberculosis chemotherapy - from concept to genomics, p. 355-403. In K. Lewis, A.A. Salyers, H.W. Taber, and R.G. Wax (ed.), Bacterial resistance to antimicrobials,. Marcel Dekker, Inc. New York, NY.
- 6) Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. 2005;45:529-64.
- 7) Rinder H, Mieskes K.T., Loshcer T. Heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis, 2001;5(4):339-345
- 8) Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S, Roudinskii N, Donnikov M, Mirzabekov A, et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug - resistant M. tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 2005;11:531-539
- 9) Migliori GB, Dheda K, Centis R, et al. Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on subSaharan Africa. Trop Med Int Health. 2010;15:1052-106
- 10) WHO. Automated Real-time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and RifampicinResistance: Xpert MTB/RIF System. 2011
- 11) 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(5):455-60.
- 12) Huh HJ, Jeong BH, Jeon K, Koh WJ, Ki CS, Lee NY. Performance evaluation of the Xpert MTB/RIF assay according to its clinical application. BMC Infect Dis. 2014;14:14:589.
- 13) Kim J, Park YJ, Lee NY, Chang CL, Lee M, Shin JH. Evaluation of the AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex in Respiratory Specimens. Korean J Clin Microbiol. 2012;15(4):117-124.
- 14) Jeong TD, An D, Sung H, Chi HS, Kim MN, Shim TS. Evaluation of the Performance of GenoType MTBDRplus Assay for Rapid Detection of Multi-drug Resistant Mycobacterium tuberculosis in Sputum Specimens. Lab Med Online. 2011;1(1):19-25.

Line probe assay (LPA)

PCR 과 Reverse hybridization를 혼합한 DNA strip assay로써 DNA 추출, PCR 증폭, Hybridization reaction 의 세 단계 과정으로 이루어진다.

- 결핵균 또는 임상 검체에서 직접 DNA 를 추출하여 각 항결핵제에 대한 내성관련 유전자 부위를 PCR 반응을 이용하여 증폭시킨다.
- 이를표지된 특이 소식자들이 붙어 있는 nitrocellulose strip에 증폭 산물을 역교잡(reverse hybridization) 반응을 시킨다.
- 표적 핵산이 존재했다면 각 strip 에 나타난 발색 정도를 판정한다.

현재 검사실에서 이용할 수 있는 상품화된 키트로는 RIF 내성을 진단하는 INNO-LiPA Rif TB (Innogenetics, Belgium), RIF과 INH 내성을 같이 진단하는 Genotype MTBDRplus assays (이하 MTBDRplus, Hain Lifescience, Germany), AdvanSure™ MDR-TB GenoBlot Assay kit(이하 AdvanSure™ MDR-TB, LG 생명과학, 한국) 및 MolecuTech REBA MTB-MDR (YD Diagnostics, 한국) 등이 있다. 최근에는 fluoroquinolone, ethambutol, kanamycin, amikacin 등에 대한 내성을 진단하는 검사인 GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience, Germany)도 개발되어 2차 약제에 대한 내성 진단에 이용되고 있다.

본 지침에서는 국내에서 가장 사용빈도가 높은 아래의 두 시약에 대해 기술하였다.

GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience)

1. 검사원리

GenoType MTBDRplus는 DNA-strip 기술을 이용하여 결핵균의 RIF 과 INH 에 대한 약제 내성을 검출한다. RIF내성 검출에는 *tpoB* 유전자의 166bp를 이용하고, INH 고도내성검출에는 *katG* 유전자의 120bp 부위를, INH 저도 내성 검출에는 *inhA* 유전자의 110bp 부위를 이용한다.

전체 검사과정은 DNA를 추출, 각 biotinylated primers를 이용한 다중증폭(Multiplex amplification), SSOP(Sequence Specific Oligonucleotide Probe)를 이용한 역교잡 반응(reverse hybridization)의 세 단계로 진행되며 streptavidin-alkaline phosphatase conjugate와 dimethyl sulfoxide가 포함된 기질을 첨가하여, 변이형 탐색자가 발색되거나 야생형 탐색자가 소실될 경우, 그 부위의 변이로 인한 내성으로 판독한다.

2. 검체

- 도말양성인 호흡기 검체 혹은 고체 혹은 액체배지에서 배양된 균주 혹은 집락.

검체를 단기간(1주 이내) 보관할 경우는 2-8°C에서 냉장보관하고, 장기 보관시는 -20°C이하로 냉동 보관한다. 1주일 이상 검사가 지연 될 경우에는 DNA 추출 후 상층액을 분리하여 -20°C이하로 냉동 보관을 권장한다.

3. 장비 및 기구

- Disposable powder free glove
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1,000 μ L
- Sterile pipette tips with filter
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Shaking water bath/TwinCubator
- Thermocycler
- Timer
- Heating block
- Centrifuge with rotor for microtiter plates (Option)

4. 시약 및 재료

- 약제 내성 관련 유전자의 아생형 또는 변이형 탐색자로 흡착된 멤브레인 스트립
- Primer, nucleotide, dye가 혼합된 시료전처리액 (Primer Nucleotide Mix)
- 추출원충용액(Denaturation Solution)
- 교잡반응액(Hybridization Buffer)
- 강력 세척액(Stringent wash solution)
- 행균 세척액(Rinse Solution)
- Conjugate 농축액
- Conjugate 원충액(Buffer)
- Substrate 농축액
- Substrate 원충액(Buffer)
- Thermostable DNA polymerase with buffer (recommendation : Hot star Taq)

5. 검사과정

1) 검체의 준비

- ① 도말양성인호흡기 검체 혹은 액체배지 또는 고체배지에 배양된 균주
- ② 도말 음성인 환자의 호흡기 검체를 직접 이용한 검사는 불가능하다.
- ③ 혈액, 소변, 대변, 척수액 등 비호흡기 검체에 직접 이 방법을 적용하는 것은 그 유효성이 입증되지 않았다.
- ④ 세균을 불활성화시키기 위해 검체를 95°C에서 15분 이상 열을 가한다.

2) 핵산추출

- ① 각 검체 종류에 따라 필요한 검체량

검체 종류	Transfer Volume
탈오염화 과정을 거친 임상검체	500 μ L
액체 배지 배양액	1,000 μ L
고체 배지 집락	300 μ L

- ② 10,000 g에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 남은 침전물에 100-300 μ L의 증류수를 섞는다.

- ③ 95°C에서 20분간 반응시킨다.
- ④ 초음파로 15분간 처리한다.
- ⑤ 5분간 스핀다운한 후 상층액 5 μ L를 PCR에 이용한다.

3) PCR반응

- ① PCR 튜브에 증폭혼합물(amplification mix) 45 μ L를 준비한다.
- ② 증폭혼합물에 5 μ L의 DNA solution을 혼합한다.
- ③ PCR을 시행한 후, 전기영동으로 결과를 확인한다.

표 1. PCR 반응 조건

Temperature	Duration	반응횟수	
		배양균주	환자검체
95°C	5 min	1 cycle	1 cycle
95°C	30 sec	10 cycles	10 cycles
58°C	2 min		
95°C	25 sec	20 cycles	40 cycles
53°C	40 sec		
70°C	40 sec		
70°C	8 min	1 cycle	1 cycle

4) 교잡반응 (Hybridization)

- ① 각 튜브에 denaturation 용액 20 μ L을 분주한다.
- ② PCR후 증폭된 DNA 20 μ L를 넣은 후 파이펫으로 잘 섞은 뒤 5분간 실온에 둔다.
- ③ 1 mL의 미리 가온한 hybridization buffer를 조심해서 각 well에 분주한다.
- ④ 각 well에 스트립을 놓는다.
- ⑤ 트레이를 shaking water bath에 놓고 45°C에서 30분간 반응시킨다.
- ⑥ Hybridization buffer를 완전히 제거한다.
- ⑦ 각 스트립에 stringent wash solution(강력세척용액) 1 mL를 넣고 shaking water bath에서 45°C에서 15분간 반응시킨다.
- ⑧ 이후 모든 단계는 실온에서 반응한다.
- ⑨ Stringent wash solution을 완전히 제거한다.
- ⑩ Shaking platform에서 1분 동안 1 mL의 rinse solution로 각 스트립을 세척한다.

- ⑪ 각 스트립에 1 mL의 희석된 conjugate를 넣은 후 shaking platform에서 30분간 반응시킨다.
- ⑫ 용액을 제거한 후 shaking platform에서 1 mL의 rinse solution으로 1분 동안 스트립을 2회 세척하고 1분 간 1 mL의 증류수로 1회 세척한다.
- ⑬ 각 스트립에 희석된 substrate 1mL를 더하고 shaking없이 암소에서 반응시킨다.
- ⑭ 증류수로 2번 세척하여 반응을 중지시킨다.
- ⑮ Tweezer를 이용하여 트레이에서 스트립을 빼내고 2장의 흡수지 사이에 넣어 말린다.

6. 결과해석과 보고

- 스트립의 각 탐색자는 27 개의 reaction zones으로 구성되어 있다.

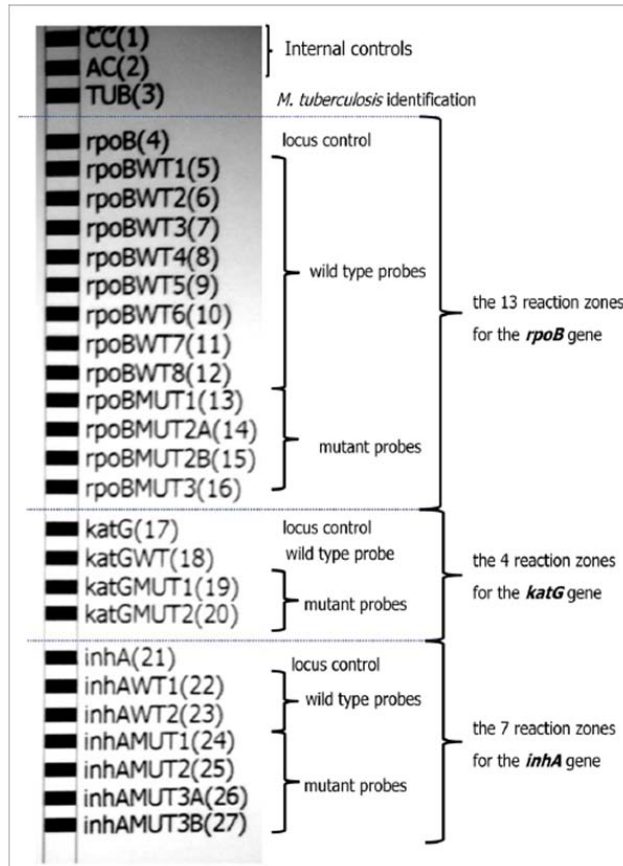


그림 1. 스트립 라인의 탐색자 정보

- 야생형 밴드가 양성이고 변이형 밴드가 음성이면 susceptible(감수성)으로 판정한다
- 변이형 밴드가 하나라도 양성이면 resistant(내성)으로 판정한다.
- 변이형 밴드가 음성이더라도 야생형 밴드 중 하나라도 음성이면 야생형 소실에 의한 resistant(내성)으로 판정한다.

1) RIF 내성 : *rpoB* 유전자

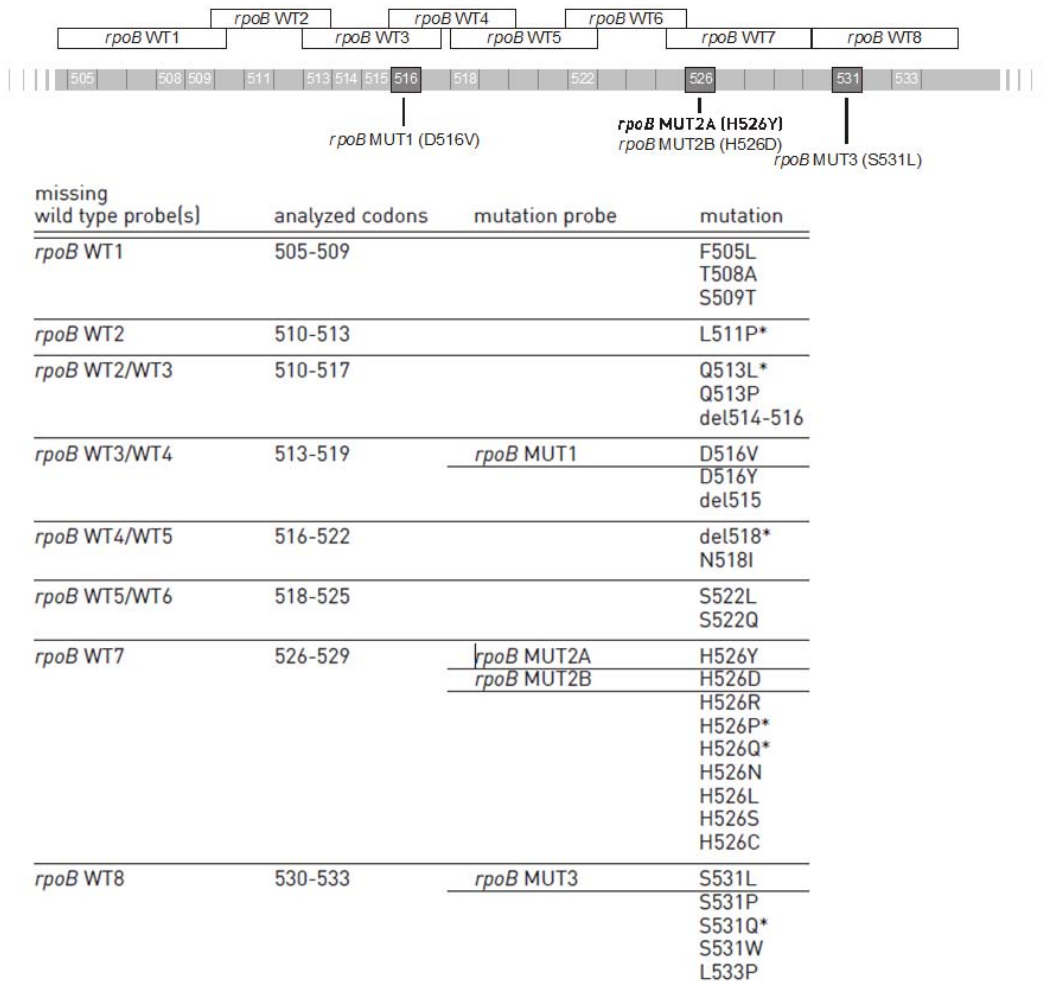


그림 2. *rpoB* 유전자의 RIF 내성 관련 부위

2) High-level INH resistance : *katG* 유전자

missing wild type probe(s)	analyzed codons	mutation probe	mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

3) Low-level INH resistance: *inhA* 유전자(110bp)

missing wild type probe	analyzed nucleic acid position	mutation probe	mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

· 판독예

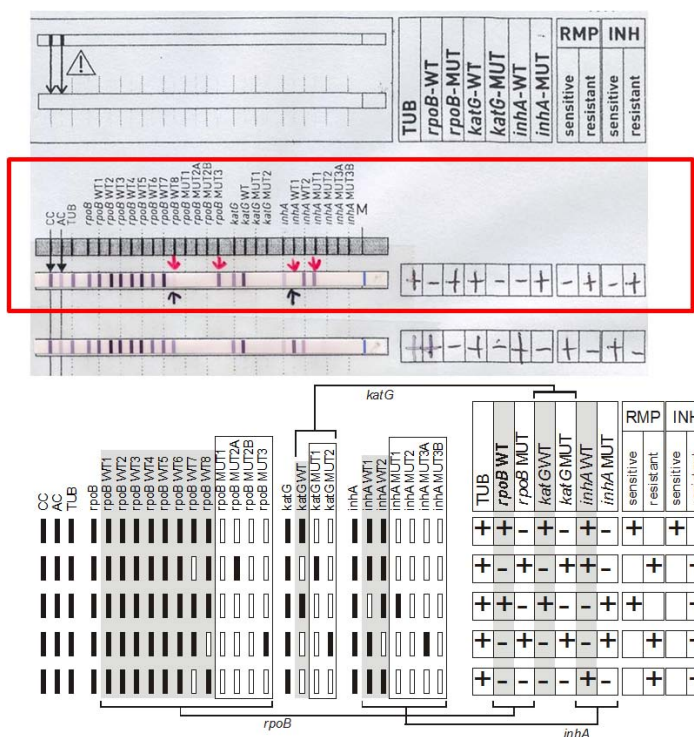


그림 3. GenoType MTBDRplus의 결과판정. *rpoB* MUT3(S531L) 양성 및 *inhA* C15T 양성.
판정: Rifampin and rifabutine resistant, low level isoniazid resistance

7. 제한점 및 문제해결

- 도말 양성인 비호흡기 검체에 대해서는 유효성이 확립되어 있지 않다.
- 침묵 돌연변이(silent mutation)가 있으면 단지 야생형 탐색자들 중 하나의 소실로만 나타날 수 있다.
- strip에 포함되어 있지 않은 변이형에 의해 약제 내성이 발생한 경우는 각 변이가 발생한 코돈의 위치는 알 수 없으며 각 코돈이 포함된 야생형 탐색자의 소실로써 내성 유무만을 판단할 수 있다 (예: *tpoB* L533P 변이형에 의한 내성 - 단지 이 코돈이 포함된 야생형 밴드인 *tpoB* WT8 소실만 보인다.)
- 야생형 탐색자나 변이형 탐색자로 설정되지 않는 부위에서 변이가 발생하면 검출하지 못한다
- Conjugate control band를 포함한 전 밴드의 세기가 약하거나 안보이는 경우.
 - 너무 낮은 실내 온도 혹은 시약의 실온화가 안 됨.
 - 소량의 Conjugate 농축액 혹은 Substrate 농축액이 들어갔거나 누락됨.
- Conjugate control band를 제외한 밴드의 세기가 약하거나 안보이는 경우
 - 부적절한 DNA 추출 및 PCR 증폭 과정
 - 2% agarose gel을 이용하여 amplicon을 확인하고, amplicon이 안보이면 DNA 분리 및 증폭과정을 다시 한다. 필요하다면 다른 방법으로 DNA를 추출한다
 - 높은 배양 온도
- 발색이 균질하지 않은 경우
 - Incubation 단계에서 strip이 완전히 담겨지지 못했을 때
 - Tray가 충분히 진탕되지 못했을 때
- High Background color
 - 과도하게 농축된 conjugate 농축액 혹은 substrate 농축액
 - 세척 단계를 적절하게 시행하지 않았을 때
 - 세척액이 지나치게 차가웠을 경우
- 기대하지 않은 결과(Unexpected results)가 나오는 경우
 - 잘못된 배양 온도
 - 교잡반응액(Hybridization Buffer) 혹은 강력 세척액(Stringent wash solution)이 적절하게 미리 가온되지 않았거나 혼합되지 못한 경우
 - DNA 산물이나 증폭 산물의 오염.
 - 교잡반응액(Hybridization Buffer)에 이웃 well 이 오염된 경우

- 부적절한 DNA 량
- 순수배양된 균주 집락이 아닌 경우
- silent mutation, 불균질 내성(Hetero-resistance), 혼합감염, 검체의 교차오염, 혹은 이전 검사 결과와 불일치 할 경우(검체 뒤바뀜, 환자의 치료 실패, 치료 중 다른 약제 감수성 결과를 갖는 결핵균에 의한 재감염을 고려해야 하며, 드물지만, INH 치료 없이도 INH 내성 균주가 감수성 균주로 변경되기도 한다).

8. 정도관리

1) 내부정도관리

- CC (conjugate control): conjugate의 결합과 substrate이 적절하게 수행되었음을 확인하기 위하여 사용된다.
- AC (Amplification control): 증폭 과정이 적절하게 수행되었음을 확인하기 위하여 사용된다. AC 밴드가 음성이라면 증폭 set up 과정에서 문제가 있었거나, 간섭 물질에 의한 carry-over 에 의할 가능성이 있다. 그러나, 약제 내성인 경우라면, AC band의 signal이 약하게 나타나더라도 증폭반응을 적절하게 수행되었음을 의미하므로 재검할 필요 없다.
- TUB (*M. tuberculosis* complex, TUB): 결핵균에서 양성을 보이며 MTB일 때 양성 밴드가 나타난다
- Locus control (*tpoB*, *katG*, *inhA*): 각 유전자 부위에 특이적인 부위로 항상 양성으로 나와야 한다.

2) 외부정도관리

- 대한임상정도관리협회 숙련도시험 프로그램이나 College of American Pathologist (CAP) proficiency test를 이용한다.

9. 참고문헌

- 1) Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR 2009;58:7-10.
- 2) World Health Organization. 2008. Interim policy guidance on drug susceptibility testing (DST) of second-line anti-tuberculosis drugs. Geneva. WHO/HTM/TB /2008.392.
- 3) 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(7):787-792.

- 4) Bwanga et al. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis. BMC Infectious Diseases. 2009, 9:67 doi:10.1186/1471-2334-9-67
- 5) Ohno et al. Relationship between Rifampin MICs and rpoB Mutations of Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(4);1053-1056.
- 6) Van Deun et al. Mycobacterium tuberculosis strains with Highly Discordant Rifampicin Susceptibility Test Results. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(11);3501-3506.
- 7) Jeong TD, An D, Sung H, Chi HS, Kim MN, Shim TS. Evaluation of the Performance of GenoType MTBDRplus Assay for Rapid Detection of Multi-drug Resistant Mycobacterium tuberculosis in Sputum Specimens. Lab Med Online. 2011;1(1):19-25.

Advansure™ MDR-TB Genoblot assay (LG Lifesciences)

1. 검사원리

Advansure™ MDR-TB Genoblot assay는 원-튜브네스티드다중비대칭중합효소연쇄반응(one-tube nested multiplex asymmetric PCR method)을 이용한 역교잡반응 라인블롯법 (reverse-hybridization line blot assay)이다. RIF 내성 검출에는 *tpoB* 유전자의 374bp 부위를, INH 고도내성검출에는 *katG* 유전자의 366bp 부위를 이용하고, INH 저도 내성 검출에는 *inhA* 유전자의 281bp와 *ahpC* 유전자의 247bp를 이용한다.

바이오틴 부착 내성 유전자 특이 프라이머를 이용하여 비대칭적인 PCR 방법으로 증폭하였고, 증폭된 DNA에 바이오틴을 부착하여 최종 바이오틴 부착 단일 가닥 타겟 DNA (biotin-labeled single-stranded target DNA)를 생성한다. 이 때 내부 대조군(internal control)과 결핵균 유래 ITS (Inter-Transcriptional Spacer) 앰플리콘(amplicon)도 동시에 형성된다.

바이오틴이 부착된 DNA (biotin-labeled single-stranded target DNA)가 나일론 멤브레인-흡착 프로브(*tpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*의 야생형 또는 변이형 프로브)와 교잡하게 된다. 교잡 반응 여부는 streptavidin-alkaline phosphatase (AP) conjugate를 첨가한 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 4-nitro blue tetrazolium chloride와의 반응을 통해 푸른색의 발색 반응이 나타나는 정도를 관찰함으로써 확인한다.

2. 검체

- 호흡기 검체, 뇌척수액을 포함한 체액, 전혈, 조직 검체
- 고체 혹은 액체배지에서 배양된 균주 혹은 집락.

3. 장비 및 기구

- Disposable powder free glove
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1,000 μ L
- Sterile pipette tips with filter
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Shaking water bath/TwinCubator
- Thermocycler

- Timer
- Heating block
- Centrifuge with rotor for microtiter plates (Option)
- Scanner

4. 시약 및 재료

- 나일론 멤브레인-흡착 탐색자가 포함된 strip
- 추출완충용액 (Extraction buffer): Ion exchange resin
- 시료전처리액 1 (Pre-treatment I X10): NaOH
- 시료전처리액 2 (Pre-treatment II): 1.5M NaCl, 0.1M NaH₂PO₄
- 2X PCR 혼합액, Primer mixture, 및 양성 및 음성 대조군
- 프로브 흡착 스트립 및 교잡반응액 (Hybridization buffer)
- 강력 세척액 (Stringent wash solution) 및 행굼 세척액 (Rinse Solution)
- 효소접합용액 (Enzyme Solution): Streptavidin conjugated alkaline phosphatase in Tris buffer
- 발색 용액 (Substrate Solution)

5. 검사과정

1) 검체 전처리

- 핵산증폭검사의 DNA 추출 술기를 참고한다

2) DNA 추출

- ① 전처리 과정 후 남아 있는 침전물에 1 mL의 조제된 시료 전처리액 2를 첨가한다.
- ② 10초간 vortex한 후 13,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하고 상층액을 제거한다.
- ③ 추출완충용액을 잘 섞은 후 50 μ L를 침전물에 첨가한다.
- ④ 100°C에서 20분간 가열한 후 원심분리하고 분리된 상층액을 PCR에 사용한다

3) PCR과정

- ① 시발체 혼합액 5 μ L와 마이코박테리아 DNA를 첨가한 후 PCR을 시행한다.
- ② 핵산부합(Hybridization)반응 수행 전까지 -20°C이하에 보관한다.
- ③ PCR 튜브에 프라이머 혼합액과 추출한 DNA를 첨가한다. 검사 시 양성대조액과 음성대조액을 같이 첨가한다.
- ④ 미리 94°C로 예열된 PCR 기기에 준비된 PCR tube를 넣고 각 PCR 반응을 진행한다.

표 2. PCR 반응 조건

Temperature	Duration	반응횟수	
		배양균주	환자검체
50°C	2 min	1 cycle	1 cycle
95°C	10 min	1 cycle	1 cycle
94°C	30 sec	15 cycles	15 cycles
65°C	1 min		
72°C	30 sec		
94°C	30 sec	20 cycles	40 cycles
55°C	1 min		
72°C	30 sec		
72°C	10 min	1 cycle	1 cycle

4) 교잡 (Hybridization)

- ① 프로브 흡착 스트립의 멤브레인에 준비한 핵산부합 혼합액 270 μ L를 분주한다.
- ② 핵산부합반응용기의 덮개를 닫고 55°C 핵산부합반응 챔버에 넣고 30분간 교반시킨다.
- ③ Pre-warming 한 후 강력 세척액(Stringent wash solution) 250 μ L를 스트립에 분주하여 55°C에서 15분 동안 9 rpm으로 수직 교반 반응을 실시하여 세척한다.
- ④ 헹굼 세척액(Rinse solution) 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 1분간 9 rpm으로 수직교반반응을 실시하여 세척한다.
- ⑤ 세척 반응이 끝난 스트립의 반응액을 vacuum suction하여 제거한다.
- ⑥ 효소접합용액 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 30분 동안 9 rpm으로 수직 교반 반응을 실시하여 세척한다.
- ⑦ 효소접합반응이 끝난 스트립의 반응액을 vacuum suction하여 제거한다.
- ⑧ 헹굼 세척액 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 1분 동안 9 rpm으로 수직 교반반응을 실시하여 세척한다.
- ⑨ 멸균증류수 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 1분 동안 9 rpm으로 수직 교반반응을 실시하여 세척한다.

- ⑩ 세척반응이 끝난 스트립의 반응액을 vacuum suction하여 제거한다.
- ⑪ 발색용액(substrate solution) 250 μ L을 스트립에 분주한 후, 빛을 차단한 조건하에서 상온에서 10분동안 9 rpm으로 수직 교반반응을 실시하여 세척한다.
- ⑫ 발색 반응이 끝난 스트립을 멸균증류수 250 μ L로 행구어 남아 있는 발색용액 및 침전물을 vacuum suction하여 완전히 제거한다. 덜 제거된 침전물은 최종 결과 판독 시 spot으로 남게 되므로 결과에 이상을 초래할 수 있다
- ⑬ 멤브레인 스트립을 헤어 드라이기를 사용하여 신속하게 건조시키거나 공기 중에서 자연 건조시킨 후, AdvanSure™ Geno Line Scan 프로그램을 이용하여 수치화 분석을 하거나, Test reference guide (Reading Card) 또는 Data Interpretation sheet를 이용해 RIF (*rpoB*), INH (*katG*, *inhA*, *ahpC*)에 대한 내성 유무를 각 locus별 야생 형과 변이형 밴드세기를 서로 비교하여 결과를 판독한다.

6. 결과해석과 보고

- 야생형 밴드와 변이형 밴드의 농도 중 하나라도 2 이상이면서 변이형 밴드의 농도와 야생형 밴드의 농도의 비가 1 이상이면 resistant (내성)으로 판정한다.
- 야생형 밴드와 변이형 밴드의 농도 중 하나라도 2 이상이면서 변이형 밴드의 농도와 야생형 밴드의 농도의 비가 1 미만이면 susceptible(감수성)으로 판독한다
- 야생형 밴드와 변이형 밴드가 모두 음성이거나 밴드 농도가 모두 2 이하인 경우는 재검을 시행하며 재검 시에도 동일한 양상을 보이면 야생형 소실에 의한 resistant(내성)으로 판정한다

표 3. Advansure MDR-TB Genoblot assay probe 정보

Wild-type probe (s)		Codons analyzed	Mutation probe	Mutation
rpoB	RW1	509-515	RM11	L5119
			RM12	Q513P
	RW2	514-520	RM21	D516V
			RM22	D516Y
	RW3	520-525	RM3	S522L
	RW4	524-530	RM41	H526Y
			RM42	H526D
			RM51	S531L
			RM52	L5339
	RW5	530-535		
katG*	KW	313-319	KM	S315T
Wild-type probe (s)		Analyzed nucleic acid position	Mutation probe	Mutation
inhA ⁺	IW	-21	IM	C-15T
ahpC ⁺	AW	-20	AM1	G-6A
			AM2	C-10A

*to detect INH high-level resistance; + 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.

[MDR-TB_RMP-INH]



Line	Code	Probe Information	Band Intensity	Ratio Check
1	CC	Conjugate Control	58.51	-
2	IC	Internal Control	2.74	-
3	TUB	M.TB complex	48.15	-
4	SC	Stringency Control	18.49	0.38
5	RW1	rpoB_locus_509-515	4.94	-
6	RM11	rpoB_L511P	-0.65	-0.13
7	RM12	rpoB_Q513L	22.90	4.64
8	RW2	rpoB_locus_514-520	32.26	-
9	RM21	rpoB_D516V	6.53	0.20
10	RM22	rpoB_D516Y	4.74	0.15
11	RW3	rpoB_locus_520-525	20.48	-
12	RM3	rpoB_S522L	4.01	0.20
13	RW4	rpoB_locus_524-530	22.28	-
14	RM41	rpoB_H526Y	4.04	0.18
15	RM42	rpoB_H526D	2.03	0.09
16	RW5	rpoB_locus_530-535	6.91	-
17	RM51	rpoB_S531L	-0.39	-0.06
18	RM52	rpoB_L533P	1.60	0.23
19	KW	katG_locus_313-319	27.83	-
20	KM	katG_S315T	1.32	0.05
21	IW	inhA_promoter_locus_-23~-2	0.35	-
22	IM	inhA_C-15T	12.84	36.56
23	AW	ahpC_promoter_locus_-19~-1	14.89	-
24	AM1	ahpC_G-6A	0.12	0.01
25	AM2	ahpC_C-10A	2.73	0.18

※ TB: 양성

[Result Interpretation]

Anti-tuberculosis drug	Result	
Rifampin(RMP)	Susceptibility(S)	☐ -
	Resistance(R)	☒ RM12
Isoniazid (INH)	Susceptibility(S)	☐ -
	Resistance(R)	☒ IM

※: Additional test required for genotyping mutation.

[Comment] --소견목록--

그림 4. Advansure™ MDR-TB Genoblot assay 결과판정. Control 및 TUB 밴드가 잘 보이며 *rpoB* 유전자의 RM12와 *inhA* 유전자의 IM에 반응이 확인되어 RIF와 INH에 모두 내성임.

7. 제한점 및 문제해결

Line probe assay 는 기본적으로 야생형 탐색자나 변이형 탐 색자로 설정되지 않는 부위에서 야생형 소실이 나 변이가 발생한 경우 내성 유전자를 검출할 수 없으며 strip 에 포함되어 있지 않은 변이형에 의해 약제 내성이 발생하면 각 변이가 발생한 코돈의 위치는 알수 없고 단지 각 코돈이 포함된 야생형 탐색자의 소실로써 내성 유 무만을 판단할 수 있다. Advansure™ MDR-TB Genoblot assay 는 야생형 밴드와 변이형 밴드가 모두 음성이거나 밴드 농도가 모두 2 이하인 경우 재검을 시행해야 하는데, 재검 후 2 이상으로 나온다면 검사 과정의 오류(교 잡반응시의 부정확한 온도와 불충분한 반응시간, 세척반응에서의 과도한 반응시간)을 고려해야 한다.

또한, PCR 증폭 산물의 부적절한 보관, 검사의 지연 등에 의해 PCR 증폭 산물의 분해가 발생하면 Conjugate control band를 제외한 밴드의 세기가 약하거나 안보일 수 있으며, 검사 과정에서 침전물이 완전히 제거되지 않으면 spot 이 생겨 위내성 결과가 나올 수 있는 등 각 검사 과정에서 오류가 나올 수 있는 원인을 정확하게 파악 하여 각 검사 과정을 정확하게 진행해야 한다.

(참조, GenoType MTBDRplus 내 7. 제한점 및 문제해결)

8. 정도관리

1) 내부정도관리

매 실험마다 각 스트립의 4개 대조군 밴드와 양성대조액, 음성대조액 결과를 각각 확인한다.

- Conjugate control: conjugate 결합, 기질 발색 정상 유무 판정의 지표가 되며, 항상 푸르게 변해야 한다.
- Internal control (IC): PCR 반응 이상 유무 판단하는데 사용된다. 프라이머를 결핵균의 ITS 부위와 공통으로 사용하고 있기 때문에 고농도 결핵균 샘플에서는 경쟁적 저해로 인해 밴드세기가 약하거나 음성 결과가 나올 수 있다.
- TUB: *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*) 인 경우 푸르게 변하므로 결핵균 감별에 이용한다. TUB 밴드가 보이지 않는데, 일부 라인에서 밴드가 보이는 경우에는 결핵균 음성이거나 검출한계 미만으로 간주한다
- Stringency control (SC): TUB 밴드세기 대비 더 약한 결과를 보여야 하며, 비정상적 교잡반응 온도에 의한 비특이성 여부를 확인할 수 있다.
- 양성 대조액(Positive control: PC): conjugate control (CC), IC에서 푸른색 밴드가 보이며, TUB 밴드세기는 SC 밴드보다 진해야 한다. 또한, 4개의 대상 유전자(*tpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*) 각 각의 locus에서 야생형

(wild type) 밴드가 변이형(mutant type) 밴드보다 더 진해야 한다. 즉, RW1, RW2, RW3, RW4, RW5, KW, IW, AW가 각 locus 내에서 다른 변이형 밴드보다 더 푸른색을 보여야 한다.

- 음성대조액(Negative control: NC): conjugate control (CC), internal control (IC) 에서 푸른색 밴드가 보여야 한다.

2) 외부정도관리

- 대한임상정도관리협회 숙련도시험 프로그램이나 College of American Pathologist (CAP) proficiency test 를 이용한다.

9. 참고문헌

- 1) 결핵진료지침(개정판). 결핵 진료지침 개정위원회, 대한결핵 및 호흡기학회, 질병관리본부, 2014
- 2) Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. MMWR 2009;58:7-10.
- 3) World Health Organization. 2008. Interim policy guidance on drug susceptibility testing (DST) of second-line anti-tuberculosis drugs. Geneva. WHO/HTM/TB /2008.392.
- 4) Agreement of drug resistant tuberculosis: emergency update 2008. WHO/HTM/TB /2008.402. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- 5) Ramaswamy, S. and Musser, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber. Lung Dis. 1998;79:3-29.
- 6) Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapa S, Roudinskii N, Donnikov M, Mirzabekov A, et al. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug - resistant M. tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 2005; 11:531-539
- 7) Migliori GB, Dheda K, Centis R, et al. Review of multidrug-resistant and extensively drug-resistant TB: global perspectives with a focus on subSaharan Africa. Trop Med Int Health 2010;15:1052-106
- 8) Kim J, Park YJ, Lee NY, Chang CL, Lee M, Shin JH. Evaluation of the AdvanSure MDR-TB GenoBlot Assay for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistant Mycobacterium tuberculosis Complex in Respiratory Specimens. Korean J Clin Microbiol. 2012;15(4):117-124.
- 9) Jeong TD, An D, Sung H, Chi HS, Kim MN, Shim TS. Evaluation of the Performance of GenoType MTBDRplus Assay for Rapid Detection of Multi-drug Resistant Mycobacterium tuberculosis in Sputum Specimens. Lab Med Online. 2011;1(1):19-25.

Real-time PCR법 (Xpert MTB/RIF, Cepheid)

1. 검사원리

Molecular beacon assay와 reverse-transcriptase PCR를 이용한다. Xpert MTB/RIF assay는 반응용기(cartridge)안에 반응표준물질이 포함되어 있으므로 검체를 모았다 한번에 검사할 필요 없이 바로 진행이 가능하고 통상적으로 검체 접수 후 2시간 이내에 결과 보고가 가능하다. 도말양성 환자에서 민감도, 특이도가 높으나 가격이 비싸고, 내성 균주와 감수성 균주가 함께 있을 경우 비율에 따라서 검출하지 못할 가능성이 있으며, 이소니아지드 내성을 확인할 수 없다는 단점이 있지만, 2011년 WHO는 다제내성결핵 관리를 위해 사용할 것을 권고하고 있다.

2. 검체

- 객담 등 호흡기검체
- 체액
- 생검검체 및 조직

3. 장비 및 기구

- Disposable powder free glove
- Vortex mixer
- GeneXpert module

4. 시약 및 재료

- Xpert MTB/RIF 카트리지
- 검체시약(Sample reagent)

5. 검사방법

1) 검체 전처리

- ① 포장용기에서 카트리지와 1 vial의 Sample Reagent를 꺼낸다.
- ② 집균검체의 경우 0.5 mL re-suspended sediment에 1.5 mL Sample Reagent를 넣고 객담의 경우 Sample reagent를 검체량의 2배 넣고 검체용기의 뚜껑을 닫는다.
- ③ 10-20회 정도 검체용기를 흔들어 준 후 15분간 검체를 상온에서 방치한다. 매 5분마다 검체를 흔들어 준다
- ④ 제공되는 파이펫을 사용하여 눈금표시까지 조심스럽게 검체를 빨아드린다.
- ⑤ 검체를 카트리지의 Chamber에 천천히 넣고 카트리지의 뚜껑을 닫는다.

※ 주의: Loading volume이 2 mL보다 적거나 검체 중에 공기방울이 있을 경우 검사오류의 원인이 될 수 있다.

2) 검사실행

- ① 컴퓨터를 켜 후, GeneXpert DX 장비를 켜다
- ② Xpert MTB/RIF 카트리지를 스캔한다. (모듈 자동 지정, 선택하시고자 하는 모듈 지정 가능)
- ③ 녹색등이 점멸하는 장비의 모듈 문을 열고 카트리지를 삽입한다.
- ④ 문을 닫으면 녹색등의 점멸이 멈추며 검사가 끝나면 녹색등이 꺼진다.
- ⑤ 저절로 문이 열릴 때까지 기다린 후, 카트리지를 꺼낸다.

6. 결과해석 및 보고

rpoB GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION

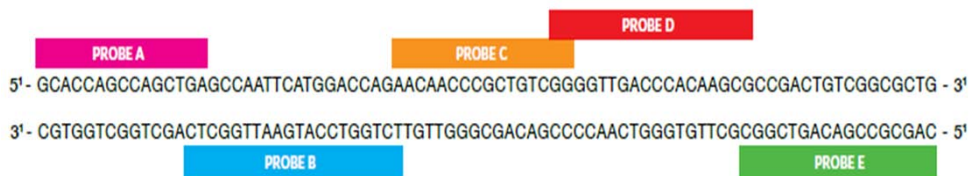


그림 5. Target probes in Xpert MTB/RIF assay (Source: Cepheid)

- Real-time PCR 전 probe 활성도를 총 3번을 checking 하여 지정한 range 안에 들어오면 “Probe Pass” 가 되어 검사가 진행 되며 만약 여기서 하나의 probe라도 fail이 되게 되면 검사는 error가 되어 검사가 중단된다. TB의 양성여부는 *rpoB* 유전자를 검출하는 probe 5개(probeA-E) 중 2개 이상이 Ct 3-38의 값을 보이면 TB 양성으로 판정한다

표 4. MTB result name and Ct value range

MTB result	Ct range
High	< 16
Medium	16–22
Low	22–28
Very low	> 28

- 5개의 Probe 의 Ct 값 중 가장 큰 값과 가장 낮은 값의 차이(delta Ct)가 4.0 이상이면 RIF 내성검출(RIF detected)로, delta Ct가 4.0 이하이면 RIF 내성미검출(RIF not detected) 혹은 감수성으로 판정한다

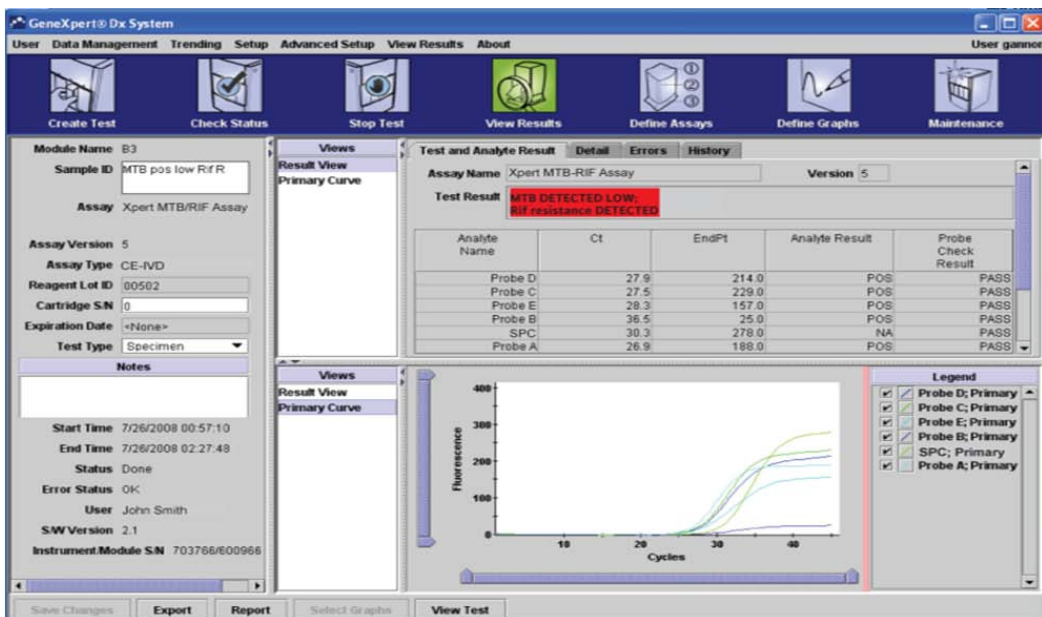


그림6. Xpert MTB/RIF assay 프로그램 화면.

- 다음과 같은 경우(Error, no results, invalid)에는 재검을 시행한다.

표 5. 재검을 시행하는 경우

Inappropriate results	Probe Check	SPC	MTB
Error	Fail	No result	No result
Invalid	Pass	Fail	Ct > 38 or 0
No results	Not applicable	No result	No result

7. 제한점 및 문제해결

도말양성 임상 검체를 사용하면 리팜핀 내성 검출의 민감도와 특이도는 높으나 가격이 비싸고, 내성과 감수성 균주가 함께 있는 경우 비율에 따라서 검출하지 못할 가능성이 있으며, isoniazid 내성을 확인할 수 없다. 배양 균주(균액)는 사용할 수 없으며 단순히 내성, 감수성 결과만 알 뿐 개별 유전자 변이형을 알 수 없다. Error나 invalid 결과가 나올 때 재검을 하면 대부분 적절한 결과를 얻을 수 있다.

초치료 환자와 같이 리팜핀 내성률이 낮은 상황에서는 양성예측도가 낮아지므로 위내성 결과를 가져 올 수 있다. 따라서 리팜핀 내성 가능성이 낮은 상황에서 내성으로 나오면 재검하거나 다른 감수성 검사법으로 확인하여야 한다. 리팜핀 내성이 검출되면 반드시 다제내성 결핵 치료에 필요한 약제에 대한 감수성 검사를 시행하도록 한다. (참조 표4. 표준법(배양법)과 신속내성법간에 불일치를 보이는 경우)

8. 정도관리

1) 내부정도관리

- Sample Processing Control (SPC): 각 cartilage 내에 감염성이 없는 세균 spore를 포함하고 있어 각 검체들이 적절하게 전처리가 되었는지 확인한다. 음성결과에서는 SPC는 음성으로, 양성검체에서는 음성 혹은 양성으로 나온다.
- Probe Check Control (PCC): real-time PCR 전 각 probe 활성도를 총 3번 체크하여 3번 모두 지정한 범위 안에 들어오면 pass 가 되어 검사를 진행하게 된다.

2) 외부정도관리

- 대한임상정도관리협회 숙련도시험 프로그램이나 College of American Pathologist (CAP) proficiency test를 이용한다.

9. 참고문헌

- 1) CDC. Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis. MMWR 2009;58:8-10
- 2) WHO. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). 2008

- 3) WHO. Automated Real-time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and RifampicinResistance: Xpert MTB/RIF System. 2011
- 4) Huh HJ, Jeong BH, Jeon K, Koh WJ, Ki CS, Lee NY. Performance evaluation of the Xpert MTB/RIF assay according to its clinical application. BMC Infect Dis. 2014;14:14:589.

유전자 염기서열분석 (Gene Sequencing)

1. 검사원리

PCR로 증폭한 DNA의 염기서열분석법은 가장 정확하고 신빙도가 높아 돌연변이 확인에 절대 표준이 된다. DNA를 추출하고 각 약제내성유전자 내 돌연변이 부위를 중합효소연쇄반응으로 증폭한다. 증폭 산물과 염기서열분석용 시약을 이용하여 염기서열반응을 시킨 후, 이를 염기서열자동분석기에서 분석하여 돌연변이 유무를 확인한다. 검체 처리 및 사용되는 데이터베이스는 핵산검출지침을 참조한다.

2. 검체

- 도말 양성인 호흡기 검체 혹은 고체 혹은 액체배지에서 배양된 균주 혹은 집락.

본 지침서의 핵산증폭검사 내용을 참조한다. 검체를 단기간(1주 이내) 보관할 경우는 2-8°C에서 냉장보관하고, 장기 보관시는 -20°C 이하로 냉동 보관한다. 1주일 이상 검사가 지연 될 경우에는 DNA 추출 후 상층액만을 분리하여 -20°C 이하로 냉동 보관을 권장한다.

3. 장비 및 기구

- Disposable powder free glove
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200 and 1000 μ L
- Sterile pipette tips with filter
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Shaking water bath/TwinCubator
- Thermocycler
- Timer
- Heating block
- Centrifuge with rotor for microtiter plates
- EP Apparatus Mupid-2Plus
- Biovision 3000

- ABI 3130xl Autosequencer
- LabChip GX

4. 시약 및 재료

- Taq Polymerase
- Chemagen PCR Pure Kit
- Chemagic Seqpure
- 100 bp DNA Ladder
- BigDye 3.1
- Pop7 Polymer
- 5X SeQrooge
- 양성 정도관리물질
- 음성 정도관리물질

5. 검사과정

1) 검체 전처리 및 DNA 추출

- 핵산증폭검사의 DNA 추출 술기를 참고한다

2) PCR과정

(1) PCR primer

No	Gene	Forward Primer	Forward Primer	Size
1	KatG315NEW	5'-tggcgggtgattgccaag-3'	5'-catgaacgacgtcgaaacag-3'	299
1'	KatG315(INH)	5'-ggtgttcgtccatacgacct'	5'-catgaacgacgtcgaaacag-3'	205
2	rpoB(RIF 165)	5'-accgcagacgttgatcaacat-3'	5'-ggcacgctcacgtgacag-3'	199
3	InhA248(INH)	5'-cctcgctgccagaaaggga-3'	5'-atcccccggtttcctccggt-3'	250
3'	InhA248(INH)	5-gtcacaccgacaaacgtcac-3'	5'-tccggaaccaggactgaac-3'	190
4	RIF1	5'-aggacgtggaggcgatca-3'	5'-ggtttcgatcgggcacat-3'	250

(2) PCR Mixture

Reagent	Reaction Volume
DW	27.75 μ L
10x buffer	5 μ L
2.5mM dNTP's	4 μ L
Primer F/R (5 pmol/ μ L)	Each 4 μ L
Taq polymerase	0.25 μ L
Master Mixture	45 μ L

(3) PCR cycles

Temperature	Time	Cycles
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	35
60°C	40 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

(4) Electrophoresis (Agarose gel 또는 Lapchip 사용)

(5) Pre-sequencing treated: PCR Product Purification

- ① 50 μ L PCR Product 를 low-well-plate 의 각 well 로 옮긴다.
- ② 150 μ L Magnetic Beads - BB 1을 각 sample에 첨가한다.
- ③ 40 μ L Elution Buffer 4를 각 well 에 sample position 에 따라 elution plate 의 지정된 well 에 미리 채워 놓는다.
- ④ Wash buffer 2, 3을 sample position 에 따라 미리 채워놓는다. Plate를 지침에 따라 tracking system 상에 위치시킨다.
- ⑤ Sample plate를 tracking system position 2에 위치시키고 다시 한번 정확한 fitting 을 확인한 후 [start] button 을 눌러서 automated isolation을 시작한다. 실온에서 2분간 incubation 한다.

3) Sequencing

- (1) Purified 된 PCR product 를 1-2 μ L를 따서 전기영동하여 purification이 잘 되었는지 확인한다, 밴드가

확인되지 않으면 PCR부터 다시 실시한다. Purification 시 DW 에 elution 하므로 바로 진행하지 않으면 건조될 수 있다. 한 번에 Plate 에 분주 후 3회 이상 연속 시행하는 것은 금지한다.

(2) PCR 실시

Reagent		Reaction Volume
Sequencing Working reagent		8 μ L
Primer F(R) (5pmol/ μ L)		1 μ L
Master Mixture		9 μ L
Temperature	Time	Cycles
96°C	10 sec	25
50°C	5 sec	
60°C	4 min	

(3) Post-sequencing treated: PCR Product Purification

- ① 96-well-plate 의 well 안에 sequencing reaction product 10 μ L를 옮겨 놓는다. 20 μ L의 Magnetic Beads 와 150 μ L의 Binding Buffers 1을 첨가한다. 분주 전에 Magnetic Beads 가 충분히 재부유 되었는지 확인한다.
- ② 4-5번 pipetting 하여 mix 한 후 실온에서 2 분간 incubation 한다.
- ③ Incubation 후 plate 를 Magnetic Separator 위에 놓아 Magnetic Beads 를 분리하고 모든 beads 가 magnet 에 부착될 때까지 기다린다. 상층액을 pipette 으로 취한 후 magnet 으로부터 plate 를 제거한다.
- ④ 100 μ L의 wash Buffer2 를 첨가한 후 bead pellet 을 up & down pipetting 하여 wash buffer에 beads를 충분히 재부유 시킨다.
- ⑤ 실온에 2분간 incubation 한다.
- ⑥ Incubation 후 Plate 를 Magnetic Separator 위에 놓아 Magnetic Beads 를 분리하고 모든 beads 가 magnet 에 부착될 때까지 기다린다. 상층액을 pipette 으로 취한 후 magnet 으로부터 plate 를 제거한다.
- ⑦ 100 μ L Wash Buffer 2로 한 번 더 bead를 씻어준다. (Repeat steps 4-6)
- ⑧ Magnet으로부터 plate를 제거한 후 실온에서 particles 이 대략 10분 정도 건조되도록 한다.
- ⑨ Beads에 pure water 20 μ L 를 첨가한 후 up & down pipetting 해서 충분히 재부유 시킨다.
- ⑩ Purified sequencing reaction product 의 elution 을 용이하게 하기 위해 가끔씩 agitation 을 주면서 실온에서 5분간 elution 시킨다.

- ⑪ Elution 후 plate 를 Magnetic Separator 위에 놓아 Magnetic Beads 를 분리하고 모든 beads 가 magnet 에 부착될 때까지 2분 동안 기다린다.
- ⑫ 정제된 Sequencing Reaction Product 를 포함하고 있는 eluate 를 깨끗한 tube 또는 plate 에 옮긴다. 정제된 sequencing reaction 은 바로 염기서열분석이 가능하다.
- (4) 96-Well Plate 에 10 μ L씩 옮긴 후 94°C 5분간 denaturation 후 바로 얼음에 cool 한다.
- (5) ABI 3130xl automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 시행하고 염기서열분석결과는 데이터베이스를 이용하여 *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank accession No. L05910)를 기준으로 변이를 분석한다.

6. 결과판정과 보고

염기서열분석결과를 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 의 Gene reference sequence와 비교하여 다른 것을 찾아낸다. Mutation 유무와 polymorphism 유무를 확인하고 working Sheet 에 기록한다. 전기 영동 및 sequence 결과 해석 시, 객관적인 기준을 사용하여 두 명의 판독자에 의해 독립적으로 해석하여 보고한다.

Rifampicin 의 내성은 95% 가 *rpoB* gene hot spot (81bp region)의 변이에 의한 것으로 이 위치의 DNA sequencing 을 통하여 변이 여부를 확인하여 약제내성 여부를 판단한다. Isoniazid 의 내성은 90% 가 *katG* Ser315Thr 변이에 의한 것이며 32% 는 *inhA* gene 의 변이에 의한 것으로 이 위치의 DNA sequencing 을 통하여 변이 여부를 확인하여 약제내성 여부를 판단한다.

7. 제한점 및 문제해결

검사방법이 복잡하여 일상 적으로 사용하기에는 어려움이 있으며 증폭 방법에 맞는 염기서열 분석 방법 및 결과를 해석할 수 있는 적절한 소프트웨어와 정도관리가 잘되고 있는 적절한 데이터베이스를 선택하는 것이 중요하다. 항결핵제 내성균 동정을 위해 염기서열을 비교할 수 있는 외부 데이터베이스로 RIDOM (Ribosomal Differentiation of Microorganisms - www.ridom-rdna.de)이 있다. GenBank/EMBL (www.ncbi.nlm.nih.gov) 와 같은 비상업적 데이터베이스는 등재 과정에서 철저히 관리되지 않기 때문에 사용하는 데 문제가 있다.

8. 정도관리

1) 내부정도관리

- 매 검사 시마다 음성정도관리물질(Negative control - Autoclaved DW)와 양성정도관리물질을 사용하여 검체와 동일한 조건에서 함께 검사를 시행한다

2) 외부정도관리

- 대한임상정도관리협회 숙련도시험 프로그램이나 College of American Pathologist (CAP) proficiency test를 이용한다.

9. 참고 문헌

- 1) katG mutations in isoniazid-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolates from Belarusian patients. Tuberkuloz ve Toraks Dergisi 2007; 55(3): 231-237
- 2) Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from China. Journal of clinical Microbiology. 2005; P5477-5482
- 3) A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Journal of Microbiological Methods. 2007; 70: 301-305
- 4) 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(5): 455-60.

II. 잠복결핵감염의 진단

결핵검사지침 II
Korean Guidelines for Tuberculosis



II. 잠복결핵감염의 진단

결핵균에 감염이 되면 5-10%만이 일생에 걸쳐 결핵이 발병한다. 대부분의 감염자는 임상적, 방사선학적, 미생물학적 이상 소견 없이 감염상태를 유지하는데 이를 잠복결핵감염이라고 한다. 따라서 잠복결핵감염으로 결론 내리기 위해서는 활동성 결핵과 반드시 감별되어야 한다.

잠복결핵은 국가결핵관리에 있어서 주요 이슈가 아니었으나 결핵 유병률이 낮은 선진국에서는 잠복결핵감염에 대한 관리를 통해 결핵 발생을 예방하고자 많은 노력을 기울이고 있다. 최근 국내에서도 학교 등에서 집단 결핵발병이 발생하고 있으며 의학 기술발달과 평균 수명의 연장으로 인해 면역력이 저하된 인구의 비율이 늘고 있다. 따라서 결핵관리에 있어서 잠복결핵감염에 대한 관심이 높아지고 있다.

잠복결핵감염을 진단을 위해서 전통적으로 tuberculin skin test (TST)가 오랫동안 이용되었다. TST에 관해서는 많은 자료와 경험이 축적된 장점이 있다. 그러나 검사과정의 복잡성과 교차반응에 의한 위양성 등의 단점이 있다. 최근 개발된 interferon-gamma release assay (IGRA)는 결핵균 특이 항원을 이용하여 교차반응에 의한 위양성이 적으며 객관적이다. 하지만 아직 축적된 자료와 경험이 많지 않아 이를 적용하는데 많은 혼선을 주고 있다. IGRA와 기존 TST를 적용하는 방식이 나라와 상황에 따라 매우 다양하며 과학적인 근거뿐만 아니라 역학적, 경제적인 고려를 통해 guideline을 정하고 있는 실정이다. 최근 개정된 결핵진료지침에서는 TST와 IGRA를 혼재하여 사용할 수 있도록 하고 있다. 즉, TST 단독, TST 후 IGRA 시행, IGRA 단독 이렇게 세가지 경우가 모두 인정되고 있다. HIV 감염과 같이 면역저하 환자에서는 민감도를 높이기 위해 두 검사를 모두 시행할 수 있다. 다만 5세 미만의 소아에서는 IGRA를 사용할 수 없다. 하지만 추후 과학적인 근거와 국내 역학지표의 변화 그리고 경제상황에 따라 잠복결핵지침이 변경될 가능성이 매우 높다.

TST나 IGRA에서 양성이더라도 결핵이 발생할 가능성은 매우 낮은 편이다. 결핵발생 위험성이 낮은 대상에서 잠복결핵감염 검사를 시행할 경우 예방화학치료로 인한 이득보다는 손실이 더 클 수 있다. 잠복결핵감염을 진단 주요 목적은 예방화학치료를 통해 결핵발병을 예방하는 것이다. 따라서 최근 결핵감염이나 면역력이 저하된 환자와 같이 결핵발병위험이 높은 경우에만 검사를 시행하는 것이 권장된다.

1. 투베르쿨린 검사 (Tuberculin skin test, TST)

한양의대 김 창 기

1. 검사원리

TST는 지연성 과민반응을 이용하여 결핵감염을 진단할 수 있는 검사법이다. 임상적으로는 주로 잠복결핵 감염을 진단하는데 사용되며 드물게 결핵진단에도 이용된다. 또한 감염률조사와 같은 역학조사를 위해서 이용될 수 있다. TST에 사용하는 결핵항원을 purified protein derivatives (PPD)라고 하는데 결핵균의 배양액에서 정제한 항원이다. 1890년 로버트 코흐가 처음으로 PPD를 생산하였고 결핵균 감염자와 비감염자 사이에 반응이 다른 점이 알려져 검사에 이용되기 시작하였다. 1908년 Mantoux가 피내주입법을 도입하였고 이후 Mantoux법이 표준검사법으로 확립되었다.

PPD는 여러 방법으로 제조되어 사용되었는데 표준화가 되지 못했고 순도가 낮았다. 1937년 Seibert가 황산암모늄을 이용한 항원정제법을 개발하여 결핵균 단백성분을 정제하였는데 이 항원이 1952년 국제표준항원(PPD-S)으로 채택되었다. 이후 세계보건기구(WHO)와 국제아동기금(UNICEF)의 지원을 받아 덴마크 State Serum Institute (SSI)에서 새로운 표준항원을 생산하였는데 이를 tuberculin RT23로 명명하였다. RT23는 WHO와 국제항결핵연맹에서 채택한 표준 tuberculin이며 2TU는 PPD-S 5TU와 역가가 비슷하다. 본 지침에서는 국내에서 사용되는 RT23을 기준으로 기술하였다.

2. 적응증

1) 적응증

- 활동성 결핵환자 접촉자
- 결핵발병의 위험성이 큰 경우(면역저하자)
- 결핵 고위험군(의료인)
- 그 외 결핵감염 진단이 필요한 경우(감염률 조사 등)

2) 금기증

- RT 23에 과민반응이 있는 경우

- 과거 검사에서 심각한 부반응을 경험한 경우 (수포, 피부괴사 등)
- 활동성 결핵환자로 진단받았거나 치료받은 과거력이 있는 경우
- 결핵감염이 확인되었거나 예방치료를 받은 과거력이 있는 경우
- 중증 바이러스 감염이 있는 경우
- 최근 4주 이내에 홍역백신을 맞은 경우 (다른 바이러스 생균 백신도 같은 기준을 적용함.)
- 단순 감기, 임신 혹은 모유수유, 검사 당일 백신을 접종 받은 경우 검사 가능함.

3. 장비 및 기구

- 판독용 투명자

4. 시약 및 재료

- Tuberculin PPD RT 23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark)
- 1 mL 주사기 (0.1 mL 단위눈금이 있어야 하며 바늘은 26-27G를 사용함.)
- 알코올솜
- 마른 솜

〈PPD 보관 시 주의사항〉

PPD는 열, 자외선에 의해 변성이 될 수 있다.
 2-8°C에서 냉장보관한다.
 온도가 자주 변하는 냉장고 문쪽에는 보관하지 않는다.
 시약을 개봉한 후 24시간이 지나면 폐기한다.
 시약을 다른 용기로 옮기지 않는다.

5. 검사과정

1) 검사 전 준비

- ① 대상자에게 TST에 대해서 설명하고 동의를 구한다.
- ② PPD 시약의 뚜껑을 제거하고 고무마개를 알코올솜으로 소독한다.

- ③ 1 mL 주사기로 PPD를 뽑는다. 이 때 집종량인 0.1 mL보다 많이 뽑은 후 공기를 제거한다.
- ④ 정확하게 0.1 mL이 되도록 조정한다.

2) Tuberculin 주입방법

- ① 검사부위는 주로 사용하지 않는 팔의 팔꿈치 5-10 cm 아래의 전박 내측으로 한다.
- ② 검사할 부위는 긁힌 자국, 부종, 화상, 습진, 발진, 흉터가 있거나 정맥이 보이는 곳을 피해 선택한다.
- ③ 검사부위를 알코올솜으로 소독하고 완전히 마른 후, 피부를 팽팽하게 당겨준다.
- ④ 주사침의 경사면이 위로 오게 하고 5-15° 각도로 거의 평행하게 피내로 찌른다.
- ⑤ 주사침의 경사면이 피내로 완전히 들어간 후 주사기와 바늘의 연결부위를 엄지손가락으로 고정시키고 PPD 시약 0.1 mL을 천천히 주입한다. (정확한 양을 주입하면 직경 6-10 mm의 팽진이 생긴다.)

3) 검사 후 처리

- ① 주사침을 폐기한다.
- ② 주사 부위와 검사 날짜 및 시간을 기록한다.
- ③ 환자에게 다음과 같은 내용을 교육한다.
- ④ 검사부위를 문지르거나 누르지 않는다.
- ⑤ 샤워는 평소대로 해도 무방하나 주사부위를 문지르지 않도록 주의한다.
- ⑥ 주사부위에 밴드 등을 붙이지 않는다.
- ⑦ 가렵더라도 긁지 않는다.
- ⑧ 48-72시간 후에 판독을 위해 재방문 일정을 확인한다.
- ⑨ 어린이에게 검사할 경우 보호자에게 위 사항을 주지시킨다.

6. 결과판정과 보고

1) 판정방법

- ① 검사 후 48-72시간에 결과를 판정을 한다.
- ② 판정은 숙련된 전문가가 시행한다.
- ③ TST 검사한 부위가 맞는지 대상자에게 확인한다.
- ④ 밝은 곳에서 검지로 촉진하여 경결(induration) 부위를 감지한다.

- ⑤ 팔의 긴축과 직각이 되는 방향으로 경결의 가장 긴 직경을 mm 단위로 측정한다.
- ⑥ 홍반(erythema)은 측정의 대상이 아니며 경결이 없는 홍반은 0 mm로 기록한다.
- ⑦ 접종 부위에 수포(blister), 소수포(vesicle) 또는 괴사(necrosis)가 있으면 따로 기록한다.
- ⑧ Tuberculin 주입 후 72시간 이상 경과하여 판독이 어려운 경우 바로 TST를 다시 시행한다.

〈Ball-point pen method〉

손가락으로 측지하여 판정하는 대신 볼펜을 이용할 수 있다.

볼펜을 경결부위 밖에서 선을 긋다가 저항이 느껴지는 곳을 표시한다.

경결의 양쪽에서 경계를 확인한 후 크기를 측정한다.

2) TST 양성 판정기준

미국 흉부학회에서는 결핵감염의 위험에 따라 5 mm 이상, 10 mm 이상, 15 mm 이상으로 양성기준을 달리 적용하고 있다. 우리나라는 국내 결핵감염률을 고려하여 10 mm 이상을 양성기준으로 적용하고 있다. 질병관리본부 국가결핵관리지침에 따르면 BCG 예방접종을 받지 않은 신생아에서 5 mm 이상을 양성으로 판정하며 면역이 정상인 소아에서 결핵환자 접촉력이 없이 우연히 검사하였을 경우 15 mm 이상을 양성으로 판정하라고 하고 있다. 또한 접종부위에 물집 같은 강한 반응이 발생하여도 결핵감염으로 간주될 수 있다.

표 1. 국내 TST 양성기준

5 mm 이상	10 mm 이상	15 mm 이상
BCG 접종력이 없는 신생아 HIV 감염자	일반적인 양성 기준	면역이 정상이며 결핵환자 접촉력이 없는 소아

3) 연속검사 (serial TST)

의료인과 같이 결핵감염 고위험군에 대해서는 주기적 검사를 실시하여 결핵감염 여부를 확인해야 한다. 그러나 과거에 결핵감염이 된 경우 면역반응이 약해져서 TST에서 음성으로 나올 수 있다. 이 경우 검사를 반복 실시하게 되면 면역반응이 증폭(boost effect)되어 양성으로 결과가 바뀌게 되고 이를 양전(conversion)으로 잘못 판단할 위험이 있다. 따라서 연속으로 TST를 시행해야 하는 경우는 처음에 2단계 TST(two step TST)를 시행하여 과거감염까지 확인하는 것이 권장된다. 2단계 TST란 기저검사(baseline test) 시 첫 TST에서 음성이더라도 1-3주 후에 다시 TST를 시행하는 것을 말하며 양성이면 결핵균에 감염된 것으로 판정되어 TST 추적검사를 시행할 필요가 없게 된다.

연속검사를 시행할 경우 결핵감염에 의해 결과가 음성에서 양성으로 전환될 수 있다. 양전에 대한 기준은 우

리나라와 미국 기준이 다르고 국내 기준도 경우에 따라 다양하여 혼선을 주고 있다. 미국의 경우 TST 반복 검사에서 2년 동안 10 mm 이상 경결크기가 증가한 경우를 양전으로 판정하며 최근 결핵감염으로 진단할 수 있다. 국내 결핵진료지침에서는 5 mm 미만인 경우 추후 검사에서 10 mm 이상일 때, 5-9 mm인 경우 6 mm 이상 경결의 크기가 증가할 때를 양전으로 판정한다. 접촉자 검진에서도 이 기준에 동일하게 적용되나 5세 미만이거나 면역 저하자의 경우는 1차 검사에서 5 mm 미만이었으나 8-10주에 실시한 2차 검사에서 6 mm 이상 증가하면 양전으로 판정한다.

7. 정도관리

TST는 피내검사이고 주관적인 검사이므로 정도관리가 매우 어렵다. 따라서 TST는 적절한 교육을 받은 숙련자가 시행하는 것이 가장 중요하다. 교육을 마친 후에는 전문가와 TST 결과를 교차평가하여 기준값 보다 많은 차이를 보이는 검사자에 대해서는 추가교육을 실시해야 한다.

8. 제한점 및 문제해결

TST는 수기검사로 tuberculin 주입과 판정이 까다로워 검사과정에서 오류가 발생할 가능성이 높다. 따라서 적절한 교육과 훈련을 받은 경험자에 의해서 시술되어야 한다. Tuberculin은 결핵항원을 추출한 것이지만 BCG와 비결핵항산균에 교차반응이 있어 이로 인한 위양성이 발생할 수 있다. BCG 접종이나 비결핵항산균 감염에 의한 반응은 결핵균 감염 때 반응보다 약하므로 경결이 클수록 결핵감염의 가능성이 높다. BCG 접종에 의한 반응은 시간이 지나면서 점차 약해지지만 반복적인 TST에 의해서 반응이 지속되거나 더 강해질 수 있다. 특히 1세 이후에 BCG 접종을 받았거나, BCG 재접종을 받은 경우 TST 양성률이 높다고 알려져 있어 주의를 요한다.

표 2. TST의 위양성과 위음성 원인

위양성의 원인	위음성의 원인
경결 측정 시 오류	경결 측정 시 오류
BCG 예방접종	Tuberculin 주입 시 오류 (피하로 주입하거나 적은 양을 주입한 경우)
비결핵항산균 감염	약독 생백신을 접종하고 4주 이내에 TST를 검사한 경우
	Anergy 혹은 면역저하
	스테로이드를 하루 kg당 0.5 mg이상 사용 시
	3개월 미만의 영아
	홍역, 수두, 인플루엔자 감염 등 일시적 면역저하 상태를 유발하는 바이러스 감염
	최근 결핵감염 (노출 후 10주 이내인 경우)
	파종성 결핵 (결핵수막염 또는 속립성 결핵)

TST는 대상자의 면역상태에 크게 영향을 받을 수 있다. 대상자가 면역력이 크게 저하된 상태라면 tuberculin에 대한 지연성 면역반응도 약해서 위음성 결과를 보일 수 있다. 생백신 예방접종이나 바이러스 감염도 일시적인 면역저하 상태를 유발하므로 위음성이 나타날 수 있다. 최초 감염 후 TST 양성 나오기 위해서는 2-10주 정도의 시간이 필요하므로 결핵환자와 접촉한 후 시행한 TST에서 음성이라도 최초 접촉 후 8-10주 후에 2차 검사를 시행하는 것이 권장된다. 또한 파종성 결핵처럼 중증의 결핵에서도 TST가 위음성일 수 있다.

결핵이 발병한 환자에서도 TST의 민감도가 74% 정도라고 보고되었다. 이는 TST가 모든 결핵감염을 검출할 수 없다는 것을 의미한다. 따라서 TST 음성이라도 결핵균 노출정도나 발병의 위험성을 고려하여 판단하는 것이 권장된다.

• 부반응(Adverse reaction)

- 검사부위에 물집, 궤양 또는 괴사 등의 심한 반응이 드물게 나타날 수 있다.
- 검사부위에 통증, 가려움, 불편감이 생길 수 있으며 흉터가 남을 수 있다.
- 극히 드물게 anaphylaxis와 같은 심한 알레르기 반응이 나타날 수 있다.

9. 참고문헌

- 1) 결핵 진료지침 개발위원회, 질병관리본부. 결핵진료지침 (2011)
- 2) 질병관리본부, 결핵연구원. 투베르쿨린 검사 가이드북 (2012)
- 3) 질병관리본부, 결핵연구원. 결핵관리 (2009)
- 4) 질병관리본부. 국가결핵관리지침 (2012)
- 5) Canadian Tuberculosis Standards 6th Ed. (2007)
- 6) Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: New Tests for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Areas of Uncertainty and Recommendations for Research. Ann Intern Med. 2007;146:340-354.
- 7) Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. Clin Microbiol Rev. 2014;27:3-20.



그림 1. Tuberculin 피내주입



그림 2. 투베르쿨린 피부반응검사 판독



그림 3. 투베르쿨린 피부반응검사 부반응(수포)



그림 4. 투베르쿨린 피부반응검사 부반응(피부 궤양)

사진: 대한결핵협회 결핵연구원 제공

2. 인터페론감마 분비능검사

전남의대 기 승 정

인터페론감마 분비능검사(interferon-gamma [IFN- γ] release assay: IGRA)는 결핵균에 감염된 사람의 T 세포가 결핵균-특이 항원과 다시 조우하면 IFN- γ 를 분비하는 원리를 이용한 검사로서 지난 10년간 두 가지 방법이 상용화되었다: ① QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT, Cellestis, Australia), ② T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK). QFT-GIT검사는 전혈(whole blood)을 사용하여 세가지 결핵균-특이 항원(ESAT-6, CFP-10, TB7.7)에 반응하여 분비된 IFN- γ 의 양을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정한다. 반면에 T-SPOT.TB는 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 사용하여 ESAT-6과 CFP-10으로 자극한 후 IFN- γ 를 분비하는 PBMC의 수를 enzyme-linked immunospot (ELISOT)로 측정한다.

IGRA는 결핵균 감염의 대체 표지자(surrogate marker)로서 결핵감염 위험도 평가, 영상소견 및 다른 의학적/진단적 결핵검사와 함께 간접(보조) 검사로 FDA 승인을 받았다. 현재까지 결핵균 감염을 검출하기 위한 표준검사(gold standard)는 없는 실정이다. IGRA는 결핵균에 대한 최근 혹은 과거 감염의 세포면역반응을 의미하기 때문에 활동성 결핵감염과 잠복감염(latent TB infection, LTBI)을 구분할 수 없다.

IGRA는 TST가 결핵균 감염진단에 이용된지 100만에 개발된 새로운 검사법이다. 이전 연구에 의하면 결핵 유병률이 낮은 지역에서 IGRA는 TST보다 특이도가 더 높고, 결핵균 노출과의 상관성이 더 우수하고, BCG 백신에 대한 교차반응이 더 적다고 보고되었다. 그러나 IGRA를 시행하기 위해서는 높은 수준의 검사실 환경과 기술 전문성이 필요하며 TST에 비해 검사비용이 고가이다.

IGRA는 TST를 대체하여 잠복결핵을 진단하기 위해 개발되었으나 활동성결핵을 검출하는데 이용될 수 없다. IGRA가 활동성 결핵감염과 잠복감염을 감별 진단할 수 없고, 특히, 결핵 유병률이 높은 지역에서는 잠복감염의 유병률이 높기 때문에 활동성 결핵에 대한 진단 특이도가 매우 낮기 때문이다.

IGRA 검사시행에 관한 내용은 검사시약별(QuantiFeron-TB Gold In-tube와 T.SPOT TB)로 따로 정리하였다.

QuantiFERON-TB Gold In-Tube®

1. 검사원리

QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Cellestis, Australia)는 인터페론감마분비검사[interferon-gamma (IFN- γ) release assay: IGRA]의 하나로 결핵균(*M. tuberculosis*) 감염을 진단하는 체외 면역학 검사방법이다. QuantiFERON-TB Gold In-Tube방법은 환자의 말초혈액을결핵균 항원(ESAT-6, CFP-10, TB7.7)으로 16-24시간 자극한 후, 과거에 결핵균에 감염된 T 세포로부터 분비되는 싸이토카인의 하나인 IFN- γ 를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정한다.

2. 검체

- 전혈(whole blood)
- 전용 튜브를 사용해야 함.

3. 장비 및 기구

- ELISA 판독기(450 nm)
- 원심분리기
- 배양기(CO₂나 습도를 맞출 필요는 없음)

4. 시약 및 재료

1) 검체용기

- 음성대조(Nil, gray cap): 건조된 생리식염수와 헤파린 및 젤이 들어있는 진공채혈관
- 검사(TB antigen, red cap): 건조된 결핵균 혼합항원(ESAT-6, CFP-10, TB7.7)과 헤파린 및 젤이 들어있는 진공채혈관
- 양성대조(Mitogen, purple cap): 건조된 phytohemagglutinin (PTH)과 헤파린 및 젤이 들어있는 진공채혈관

2) IFN- γ ELISA 시약

- Microplate strips: 24 strips $\times$ 8 wells
- Human IFN- γ standard, lyophilized: 1 vial
- Green diluent: 1 vial
- Conjugate 100 $\times$ concentrate, lyophilized: 1 vial
- Wash buffer 20 $\times$ concentrate: 1 vial
- Enzyme substrate solution: 1 vial
- Enzyme stopping solution: 1 vial

시약은 냉장(2-8°C)에 직사광선을 피하여 보관한다. 검사에 사용되는 시약은 냉장고에서 꺼낸 후 차가운 상태에서 검사가 바로 진행되지 않도록 냉장고에서 미리 꺼내둔다. 시약은 제품 포장에 명시된 유효기간까지 안정하다. 개봉된 시약은 3개월 이내에 사용하도록 한다.

3) 기타 시약

- 96-well plate 및 tube
- 증류수(DW)

5. 검사방법

1) 검체 준비

QuantiFERON-TB Gold In-Tube검사용 검체는 말초혈액(전혈)이며 환자의 준비에 특이사항은 없다. 검체 채취는 생리식염수, 결핵균 항원, phytohemagglutinin (mitogen)이 각각 첨가된 nil (음성대조), antigen (검사), mitogen (양성대조)전용 헤파린 진공용기에 1 mL씩 채혈한다. 채혈 후 용기의 벽면이 혈액으로 완전히 도포될 수 있도록 충분히 흔들어 준다(10회 위아래로 뒤집어주거나 5초간 부드럽게 흔들어준다). 검체가 들어 있는 용기는 세워서 검사실까지 운반하며, 37°C 배양기에 들어가기 전까지 실온에서 16시간 이내에 보관한다(냉장보관은 금지한다).

〈부적합 검체〉

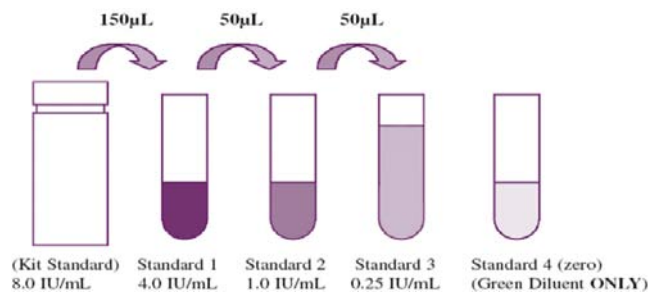
- 혈액량이 0.8-1.2 mL 오차범위를 벗어난 검체
- 고형 및 점액성 검체
- 혈장을 제외한 검체
- 채혈 후 16시간이 경과한 검체
- 냉장 보관된 검체

2) 배양 및 혈장분리

- ① 채혈 후 바로 37°C 배양에 들어가지 않으면, 37°C 배양에 들어가기 전에 충분히 혼합을 더 해 준다.
- ② 37°C에서 검체용기를 세워서 16-24시간 동안 배양을 해 준다(배양기는 CO₂, humidity를 필요로 하지 않는다).
- ③ 37°C 배양이 끝나고 1,500-2,000 g에서 5-15분간 원심해 준다. 젤이 세포층과 혈장으로 분리해 준다. 위의 단계를 바로 실행 할 수 없을 시에는, 원심분리를 수행하지 않고, 용기를 2-27°C 사이에서 3일 동안 보관 하는 것 또한 가능하다.
- ④ 혈장을 따서 보관 또는 ELISA를 시행한다.

3) IFN- γ standard 준비

- ① Standard bottle에 적절한 양(standard lable에 표기되어 있음)의 D.W를 넣는다(제조된 8.0 IU/mL standard는 2-8°C에서 3개월간 보관 가능).
- ② Shaking plate에 10분가량 둔다.
- ③ 4개의 tube를 준비하고 각각의 tube에 150 μ L의 green diluent를 넣는다.
- ④ 아래 그림처럼 차례로 150 μ L, 50 μ L, 50 μ L를 각 tube에 넣어서 4개의 standard로 만들어 사용한다.



4) Conjugate 제조

- ① Conjugate bottle에 300 μ L의 D.W를 넣는다.
- ② Microplate shaker에 10분가량 둔다.
- ③ 사용 시마다 아래 표를 참고로 하여 100배 희석해 사용한다(reconstitution된 conjugate은 6시간 이전에 사용하도록 한다).
- ④ Conjugate 100 $\times$ concentrate는 사용직후 냉장 보관한다.

Number of strips	Conjugate 100 $\times$ concentrate (μ L)	Green diluent (mL)
2	10	1.0
3	15	1.5
4	20	2.0
5	25	2.5
6	30	3.0
7	35	3.5
8	40	4.0
9	45	4.5
10	50	5.0
11	55	5.5
12	60	6.0

5) 1x wash buffer 제조

- 아래 표의 조성을 참고하여 D.W로 희석한다.

Strip number	20 $\times$ wash buffer (mL)	D.W (mL)
1	2	38
2	4	76
3	6	114
5	10	190
7	14	266
9	18	342
10	19	361
11	21	399
12	23	437

6) IFN- γ ELISA

- ① 배양이 끝난 검체용기를 clean bench로 옮기고 150-200 μ L 혈장을 취해 96-well plate에 옮긴다(2-8°C에서 4주, -20°C이하에서 3개월 보관 가능).
- ※ 주의: 적혈구가 같이 따라 올라오면 spin down을 실시한다.
- ② 분비된 IFN- γ 가 골고루 퍼지도록 하기 위해 사용 전 검체를 혼합한다.
- ③ 50 μ L의 conjugate sol.을 well에 분주한다.
- ④ 50 μ L의 혈장을 well에 분주한다(아래 표 참조).
- ⑤ 50 μ L의 standard를 well에 분주한다.
- ⑥ Microplate shaker를 이용하여 골고루 섞은 후 2시간 동안 실온 배양한다.
- ⑦ 350 μ L의 wash buffer로 washing 6회(각각의 step마다 well의 물기를 타월에 두드려서 완전히 제거한다).
- ⑧ 100 μ L의 substrate 분주한다(substrate은 반드시 덜어서 사용한다).
- ⑨ 빛 차단, 실온에서 30분 배양한다.
- ⑩ 50 μ L의 stop solution을 분주한다.
- ⑪ 5분 이내에 450 nm/620 nm 파장에서 판독한다.

Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

※ 주의사항

- Enzyme substrate solution은 발암성 물질인 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine 을 포함하고 있어서 섭취하거나 흡입하거나 피부에 접촉하지 않도록 장갑을 착용한다.
- Enzyme stopping solution은 H_2SO_4 을 포함하고 있어서 섭취하거나 흡입하거나 피부에 접촉하면 해로운 물질이므로 장갑과 실험복을 착용한다. 만약에 눈이나 피부에 접촉하게 되면 흐르는 물에 여러 번 씻어내고 의사와 상담한다.

- IFN- γ standard와 100 $\times$ conjugate concentrate을 다룰 경우 장갑과 실험복을 착용한다.
- 감염의 위험성이 있는 혈액 검체를 다루는 경우 NIH/CDC 가이드라인을 참고하여 주의하여 다룬다.
- Thimerosal은 시약의 보존제로 사용되며 섭취하거나 흡입하거나 피부에 접촉하면 유독하다
- Green diluent은 mouse 혈청과 casein을 포함하고 있어서 알러지 반응을 유발할 수 있으니 피부에 접촉하지 않도록 주의한다.
- 혈액응고제로는 헤파린만을 사용한다. 다른 항응고제는 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다.
- 혈액은 반드시 상온상태($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)로 보관되어 검사실에 옮겨져야 한다(이 온도범위를 벗어나는 경우 온도유지기능이 있는 container의 사용을 권고한다).
- ELISA키트의 구성품은 냉장($2-8^{\circ}\text{C}$)에서 보관한다.
- Conjugate 100 $\times$ concentrate를 제외하고 모든 ELISA 구성품은 사용 전에 상온으로 가져온다.
- Conjugate 100 $\times$ concentrate 은 항상 냉장($2-8^{\circ}\text{C}$)으로 보관한다.
- ELISA를 수행할 때마다 키트의 standard는 새롭게 희석하여 준비한다.
- Standard와 conjugate는 제조 후에 3달 이후에는 사용할 수 없다.

6. 결과판독과 보고

QFT analysis software를 사용하여 standard curve가 유효한 조건을 충족하는 경우 검사 결과를 보고한다(아래 표 참조). Standard curve가 fail이 나온 경우는 재검사를 해야 한다.

또한 검사결과가 indeterminate로 나올 경우 1회 재검을 권고한다.

〈IFN- γ ELISA 검사가 유효한 경우〉

- Standard 1의 평균 OD 값은 0.600이상이어야 한다.
- Standard 1과 standard 2 OD값은 CV%가 15% 이내여야 한다.
- Standard 3과 standard 4 각각 두 번의 OD값은 그들의 평균 OD값에서 0.04 이상 차이가 나서는 안 된다.
- Correlation coefficient(r)은 0.98 이상이어야 한다.

표. QFT 결과분석 기준

Nil (IU/mL)	TB Antigen minus nil (IU/mL)	Mitogen minus Nil (IU/mL)	Result	Report/interpretation
≤8.0	<0.35	≥0.5	negative	<i>M. tuberculosis</i> infection not likely
	≥0.35 and <25% of nil value	≥0.5		
	≥0.35 and ≥25% of nil value	any	positive	<i>M. tuberculosis</i> infection likely
	<0.35	<0.5	indeterminate	Result are indeterminate for TB antigen responsiveness
	≥0.35 and <25% of nil value	<0.5		
≥8.0	any	any		

7. 정도관리

표준곡선(standard curve)의 직선성을 확인하고, 각각의 검체마다 음성대조로 nil 용기와 양성대조로 mitogen용기를 사용한다.

8. 참고문헌

- 1) QuantiFERON-TB Gold (In-Tube method) package inset. The whole blood IFN-gamma test: Measuring responses to ESAT-6, CFP-10 and TB7.7 peptide antigens. Cellestis Limited.

T-SPOT[®].TB

1. 검사원리

T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK)는 결핵균 항원의 자극에 반응하는 effector T 세포를 enzyme-linked immunospot (ELISPOT)방법으로 검출하는 인터페론감마분비검사(IGRA)의 하나로 결핵균 감염을 진단하는 체외 면역진단 검사방법이다. T-SPOT.TB방법을 간단히 설명하면 말초혈액으로부터 단핵구(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 분리하여 검사에 방해되는 간섭물질을 세척하여 제거한다. PBMC의 수를 계수하여 검사에 표준화된 세포수가 사용되도록 맞춘다. 이렇게 하면 면역체계가 약화되어 T세포 수가 낮은 사람이라도 microtiter well에 정상인과 같은 적절한 세포 수가 들어가도록 보장해준다. 각 검체당 4개의 well이 필요하다. 첫째 well은 비특이적 세포활성을 확인하기 위한 음성대조(Nil control)로, 둘째와 셋째 well 등은 결핵특이 항원인 ESAT-6와 CFP-10이 첨가되어 본 검사로, 마지막 well은 PBMC가 기능을 제대로 하는지 검증하기 위한 phytohemagglutinin이 첨가된 양성대조로 사용된다. PBMC를 각각의 항원과 배양하여 감작된 T세포가 자극되도록 한다. 분비된 IFN- γ 는 well membrane위에 도포된 anti-IFN- γ 항체로 포획하고 나머지 세포나 물질은 세척하여 제거한다. Alkaline phosphatase가 conjugation된 두 번째 항체를 첨가하여 membrane 표면에 포획된 IFN- γ 와 결합하도록 하고 결합하지 않은 것은 세척하여 제거한다. 용해성 기질(soluble substrate)을 각 well에 첨가하면 부착된 효소가 이를 분해하여 반응이 일어나는 위치에 비용해성 침착물의 점(spot)을 형성한다. 각 점은 IFN- γ 을 분비하는 개별 T세포의 흔적을 나타내며 이 점들의 수를 조사하면 말초혈액내에 결핵균에 특이적으로 반응하는 effector T 세포의 수를 측정할 수 있다. 이러한 방법상의 특징으로 인하여 ELISPOT은 전통적인 ELISA 방법보다 민감도가 더 높다.

2. 검체

검체는 전혈에서 분리한 PBMC이며 환자의 준비에 특이사항은 없다. 특히 면역적합자의 경우 검사에 충분한 수의 PBMC를 확보하기 위한 채혈량은 아래와 같은 지침에 따라 채취한다.

- 성인 혹은 10세 이상의 소아: 8 mL CPT tube (1개), 4 mL CPT tube (2개), 6 mL lithium heparin tube (1개) 중에 택일.
- 2-9세 사이의 소아: 4 mL CPT tube (2개), 6 mL lithium heparin tube (1개) 중에 택일.
- 2세 미만의 소아: 2 mL 소아용 tube (1개).

검체가 들어 있는 용기는 검사일까지 운반하고, 원심분리에 들어가기 전까지 실온(18-25°C)에서 8시간, T-Cell Xtend™ (Oxford Immunotec) 시약으로 처리할 경우 32시간까지 보관하며 냉장이나 냉동 보관은 금지한다.

〈부적합 검체〉

- 고형 및 점액성 검체
- 냉장 보관된 검체

3. 장비 및 기구

- PBMC 수를 계산하는 장치나 시약: Trypan Blue, 현미경, Neubauer 혈구계산기 혹은 자동혈구계산기
- 생물학적 안전상자(Class II)
- 습도조절 배양기(37°C, 5% CO₂)
- 원심분리기(1,800 g, 18-25°C)
- 자동 혹은 수동 microtiter plate 세척장치
- 피펫과 피펫 팁
- Microtiter plate 판독장치: 자동 ELISPOT판독기나 현미경

4. 시약 및 재료

1) T-SPOT.TB 96 키트

- 96-well microplate: 1 plate
- Panel A (ESAT-6): 2 vials (0.7 mL each)
- Panel B (CFP-10): 2 vials (0.7 mL each)
- Positive control (PHA): 2 vials (0.7 mL each)
- 200x concentrated conjugate: 1 vial (50 µL)
- Enzyme substrate solution (BCIP/NBT): 1 bottle (25 mL)
- T-SPOT.AutoReporter program

시약은 냉장(2-8°C)에 직사광선을 피하여 보관한다. 검사에 사용되는 시약은 냉장고에서 꺼낸 후 차가운 상태에서 검사가 바로 진행되지 않도록 냉장고에서 미리 꺼내둔다. 시약은 제품 포장에 명시된 유효기간까지 안정하다.

2) 검체채취용기

- CPT (Cell Preparation Tube) tube 혹은 heparin tube

3) 기타 시약

- PICOLL-PAQUE PLUS 혹은 PBMC 분리물질
- PBS 용액(GIBCO 1x D-PBS)
- 증류수(DW)
- 세포 배양액(GIBCO AIM V): 혈청이 존재하지 않는 배양액의 사용을 권고하며 RPMI 1640 배양액은 초기 검체처리 과정에서만 사용할 것을 권고한다. 배양액은 적절하게 분주하여 보관하고 사용하고 남은 분주 배양액은 버리도록 한다. 세포 배양액은 사용 전에 37°C에 맞추어 둔다.

5. 검사방법

1) PBMC 분리 및 항원 자극 (Day 1)

- ① 각 CPT tube, sodium/lithium heparin tube 에 혈액을 채혈한다.
- ② 8 mL CPT tube는 1,600 g, 4 mL CPT tube는 1,800 g로 30분간 18°C에서 원심하여 PBMC를 분리한다.
Heparin tube을 사용한 검체(혹은 T-Cell Xtend시약으로 처리하여 8-32시간 보존한 검체)는 같은 부피의 RPMI 1640 배지로 희석한 후, 이를 FICOLL-PAQUE PLUS 용액 위에 2:1 혹은 3:1의 비율로 조심스럽게 쌓는다. 그리고 이를 실온(18-25°C)에서 1,000 g로 22분간 원심한다.
- ③ PBMC 층을 피펫으로 채취하여 15 mL 원심분리관에 옮겨 AIM-V배지나 RPMI 1640 배지로 10 mL로 맞춘다.
- ④ 600 g로 7분간 원심하여 상층액을 제거하고 세포를 1 mL AIM-V나 RPMI 1640 배지에 재부유한다.
- ⑤ 여기에 신선한 AIM-V나 RPMI 1640 배지를 첨가하여 10 mL로 다시 맞추어 350 g로 7분간 원심한다.
- ⑥ 상층액을 제거하고 0.7 mL AIM-V 배지에 재부유한다.
- ⑦ Trypan Blue로 PBMC를 염색하여 Naubauer혈구계산기나 자동혈구계산기로 stock cell PBMC부유액의

살아있는 세포의 농도(cells/mL)를 계산한다.

- ⑧ 이를 총 부피가 500 μL (2.5×10^5 cells/100 μL)가 되도록 AIM-V 배지로 맞춘다.
- ⑨ 냉장보관된 microtiter plate을 실온으로 맞춘다(보호 플라스틱 베이스를 제거하지 않는다).
- ⑩ 아래 표와 같이 환자 검체당 4개의 well을 준비하여 각 well에 맞는 시약을 50 μL 씩 첨가한다. 이 때 피펫 팁이 membrane에 닿지 않도록 한다. 시약이 membrane을 고르게 덮도록 plate를 부드럽게 두들겨 혼합한다(세게 흔들면 well간에 시약이 오염될 가능성이 있다).

Well (reagent)	Reagent (μL)	PBMC (μL)	No. of PBMCs
Nil control (AIM-V)	50	100	2.5×10^5
Panel A (ESAT-6)	50	100	2.5×10^5
Panel B (CFP-10)	50	100	2.5×10^5
Positive control (PHA)	50	100	2.5×10^5

- ⑪ 각각의 well에 준비된 100 μL 의 PBMC부유액을 첨가한다. 세포부유액을 분주하기 전에 세포가 잘 혼합되도록 부드럽게 위아래로 피펫팅한다. Well 간의 오염을 방지하기 위하여 세포를 각 well에 분주할 때 새로운 팁을 사용한다.
- ⑫ Microtiter plate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 16-20 시간 배양한다. 배양 중에는 plate를 그대로 두고 겹쳐 놓지 않는다(겹쳐두면 온도분포나 환기가 고르지 않게 된다).

2) ELISPOT (Day 2)

- ① Plate를 배양기에서 꺼내고 세포배양액을 버린다. 동시에 Substrate 용액을 준비하여 실온에 방치한다.
- ② Plate well을 200 μL 의 신선한 D-PBS로 4회 세척한다. 세척한 후 남아있는 PBS는 plate를 뒤집어 흡수지에 털어낸다.
- ③ 200x concentrated conjugate 25 μL 을 PBS 4,975 μL 에 첨가하여 총 5 mL의 working conjugate를 제조한다.
- ④ 이 working conjugate 50 μL 을 각 well에 첨가하고 2-8°C에서 1시간 배양한다.
- ⑤ Conjugate를 버리고 plate well을 D-PBS로 4회 세척한다.
- ⑥ Substrate solution 50 μL 를 각 well에 첨가하고 7분간 실온에서 배양한다.
- ⑦ 이 plate를 증류수로 철저히 세척하여 발색반응을 중단시킨다.
- ⑧ 이 plate를 환기가 잘 되는 곳에서 실온에서 overnight 건조하거나 37°C 오븐에서 4시간 건조한다.
- ⑨ 각각의 well membrane에 나타난 구별이 가능한 검푸른 점(spot)을 적절한 현미경을 이용하여 육안이나 자동 ELISPOT 판독기로 계수하여 기록한다.

6. 결과판독과 보고

결과는 각 Panel well의 spot수에서 음성대조(Nil)의 spot 수를 뺀셈하여 다음과 같이 해석한다. 검사결과가 indeterminate이나 borderline으로 나올 경우 새로운 검체를 이용하여 새로운 검체로 재검사를 권고한다. 양성 결과는 그 검체에 결핵균에 반응하는 effector T 세포가 존재한다는 의미이다. 음성 결과는 그 검체에 결핵균에 반응하는 effector T 세포가 존재하지 않을 가능성이 있다는 의미이다.

- 1) **Indeterminate**: 양성대조의 spot수가 20미만이거나 음성대조 spot 수가 10 초과인 경우. 그러나 이런 경우라도 Panel A와 Panel B의 결과가 'Positive'로 나오면 결과는 Positive로 보고한다.
- 2) **Borderline (equivocal)**: (Panel A - Nil Control)와 (Panel B - Nil Control)중 높은 쪽의 spot 수가 5, 6 혹은 7인 경우. 즉 어느 하나의 spot수가 cut-off에 근접하며 다른 하나가 이보다 낮은 경우 비록 양성기준에 맞더라도 cut-off에서 먼 양성의 결과보다 신뢰도가 떨어지기 때문에 새로운 검체로 재검이 요구된다. 재검 결과가 여전히 borderline일 경우, 다른 진단검사나 역학정보를 사용하여 결핵감염여부를 진단해야 한다.
- 3) **Positive**: (Panel A minus Nil Control) 와 (Panel B minus Nil Control)의 모두 혹은 어느 하나의 spot 수가 ≥ 6 인 경우.
- 4) **Negative**: (Panel A minus Nil Control) 와 (Panel B minus Nil Control)의 spot수가 모두 ≤ 5 인 경우.

7. 정도관리

전형적인 결과는 음성대조(Nil)에서 spot이 없거나 거의 관찰되지 않고 양성대조에서 20이상의 spot이 관찰된다. 현재 IGRA 검사에 대한 외부정도관리 프로그램이 없으며 검사실간 비교 등의 대한 방법도 제시된 바가 없다.

8. 제한점과 문제해결

- 〈검사결과에 영향을 미칠 수 있는 사항〉
- 부정확하게 세포를 희석하여 사용할 경우
 - 배양 중에 5% CO₂을 공급하지 못할 경우

<주의 및 제한>

- 인체유래 검체를 취급할 경우 주의해야 하며 모든 혈액은 잠정적으로 감염의 가능성이 있다고 간주한다.
- 혈액 검체와 검사시약의 취급, 보관 및 처리는 적절한 생물학적 위험 안전관리 지침에 따라야 한다.
- 모든 화학물질은 잠재적으로 위해성이 있으므로 작업할 때 주의하여야 한다.
- 채취된 혈액은 8시간내에 PBMC를 분리하여 ELISPOT를 시행하여야 한다. T-Cell Xtend시약을 사용하면 32시간까지 실온에 검체를 보관할 수 있다.
- 전혈 검체는 실온(18-25°C)에서 보관하며 냉장이나 냉동 보관은 금지한다. T-Cell Xtend시약을 사용하면 검체는 10-25°C에서 운반 및 보존되어야 한다.
- 음성결과가 결핵균의 감염이나 노출의 가능성을 배제하지 못한다.
- BCG와 대부분의 항산균은 ESAT-6이나 CFP-10 항원을 보유하고 있지 않지만 *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. goodii*는 예외적으로 상기 항원을 보유하고 있다.
- 검사과정 중 어떠한 경우라도 plate membrane을 피펫 팁이나 자동세척 팁으로 건들지 않는다. 만약 흔적이 생기면 artifact를 만들어 결과에 간섭을 줄 수 있다.

9. 참고문헌

- 1) T-SPOT.TB 96: 96-well plate format (TB.200) package inset. Oxford Immunotec.

III. 비결핵항산균 감염의 검사실 진단

결핵검사지침 II
Korean Guidelines for Tuberculosis



III.

비결핵항산균 감염의
검사실 진단

전세계 인구의 약 1/3이 결핵에 감염된 적이 있는 등 결핵은 매우 심각한 문제를 야기하고 있다. 이와 더불어 최근 비결핵항산균(NTM)에 의한 감염의 빈도가 급격히 증가하고 있는 점에도 주의를 기울여야 한다. NTM은 호흡기 감염뿐만 아니라, 림프절염, 피부 및 연부조직 감염, 및 침습성 감염 등을 유발한다. (표1)

1975년 마이코박테리움은 약 30 여종으로 구분되었지만, 최근 마이코박테리움은 약 120종 이상으로 균종의 수가 크게 늘어났다. 마이코박테리움은 Runyon의 분류(표2)에 따라 형태 및 색소형성의 차이로 구분이 가능하며, 전통적인 생화학적 반응을 이용한 동정이 널리 이용되었다. 하지만, 최근 균종 수가 증가하고, 유전학적 방법에 따른 신종의 수가 증가함에 따라 이전의 Runyon의 분류 체계 및 전통적인 생화학적 반응을 이용한 균종 분류법으로는 동정이 쉽지 않아 유전학적 방법을 포함한 새로운 동정법의 이용이 필요하게 되었다.

이러한 관점에서 NTM에 의한 감염증 환자의 적절한 관리를 위해 임상미생물검사실에서는 NTM의 검출을 위한 도말과 배양에 관해 관심을 가져야 하며 특히 임상검체에서 흔히 검출되는 NTM의 균종 동정에 대해 알고 있어야 한다.

표 1. NTM에 의한 주요 감염질환 및 관련된 NTM 균종

임상질환	원인 균종
호흡기 질환	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> <i>M. xenopi</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i>
림프절염	<i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. haemophilum</i> ,
피부 및 연부조직감염	<i>M. marium</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i> <i>M. ulcerans</i> , <i>M. haemophilum</i>
침습성 감염	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> <i>M. chelonae</i> , <i>M. haemophilum</i>

표 2. Runyon에 따른 NTM의 분류

I군	Photochromogens
	<i>M. kansasii</i>
	<i>M. marinum</i>
	<i>M. simiae</i>
	<i>M. genavense</i>
	<i>M. asiaticum</i>
II군	Scotochromogens
	<i>M. scrofulaceum</i>
	<i>M. szulgai</i>
	<i>M. xenopi</i>
	<i>M. celatum</i>
	<i>M. gordonae</i>
	<i>M. flavescent</i>
III군	Nonphotochromogens
	<i>M. avium</i>
	<i>M. intracellulare</i>
	<i>M. paratuberculosis</i>
	<i>M. terrae</i> and <i>M. triviale</i>
	<i>M. shimoidae</i>
IV군	Rapid Growers
	<i>M. fortuitum</i>
	<i>M. chelonae</i>
	<i>M. abscessus</i>
	<i>M. thermoresistible</i>

1. 도말 및 배양검사

인제의대 신 정 환

NTM의 검출을 위한 도말 및 배양방법은 결핵균의 검출을 위한 기본적인 도말 및 배양방법과 동일하다. 따라서 원칙적으로 NTM검출을 위한 별도의 도말 및 배양법은 시행하지 않으며 결핵균의 검출을 위한 도말 및 배양방법으로 대체 가능하다. 다만 일부 NTM의 특성에 따라 방법의 차이가 있을 수 있으며, 이 때에는 결핵균의 도말 및 배양방법에 추가적으로 시행 가능하다.

따라서 도말 및 배양과정은 1차 결핵검사지침서의 내용을 참조하고, 본 2차 지침서에서는 NTM에서의 차이점에 대해서만 간략하게 기술하도록 한다.

1. 검체전처리

검체의 전처리 과정도 결핵균의 도말 및 배양을 위한 방법과 동일한 방법으로 진행하게 된다. 하지만 cystic fibrosis (CF) 환자에서는 차이가 있다. 다수의 CF환자에서 호흡기내에 *Pseudomonas aeruginosa*가 존재하는데, 이 균이 배지에서 마이코박테리움보다 빨리 자라 마이코박테리움의 증식을 방해하게 된다. 그러므로 조금 다른 오염제거 방법을 사용하는 것이 좋다. 2단계 NALC-NaOH-oxalic법이 그 중 하나이다. 하지만 이 방법은 마이코박테리움의 생존능력에 영향을 미칠 가능성이 있고, 소아 CF환자에서 *M. abscessus*의 검출에 대한 효과는 불분명하다고 보고된 바 있다. CF환자에서 NTM의 검출을 시도한 Ferroni 등은 NALC-NAOH-oxalic acid와 chlorhexidine 오염제거법의 비교에서 chlorhexidine법이 오염율은 더 높았음에도 불구하고 NTM의 검출률이 2배 높음을 보고한 바 있다.

2. 도말검사

항산성 염색이 대부분의 마이코박테리움에 양성소견을 보이지만, 그 외의 다른 세균, 즉 *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*, *Cryptosporidium*, *Isospora* 및 다른 microsporidia에서도 양성의 결과가 나올 수 있음을 알고 있어야 한다.

결핵균을 포함한 slow-growing mycobacteria는 늘 일정하게 항산성 염색에서 양성소견을 보이지만, rapidly growing mycobacteria의 경우 염색성이 매우 다양하게 보이며, 특히 형광염색의 경우 음성일 수 있다.

3. 배지선택

마이코박테리움에는 약 120종 이상의 종으로 구성되어 있고, 결핵배양과 동일한 방법으로 검출이 가능하다. NTM 배양은 고체배지보다 액체배지에서 더 잘 자라는 특징이 있고, *M. genavense*는 액체배지에서만 자라는 특징이 있다. 일부 균종은 적절한 배양을 위해 특별한 영양성분을 필요로 하기도 한다. *M. haemophilum*과 *M. genavense*는 최적의 증식에 철분이 필요하다. 따라서 피부, 뼈 및 관절 등에서 채취한 검체는 hemin, ferric ammonium citrate 또는 X-factor 검사를 위한 스트립과 같이 철분 성분이 보충된 배지에 접종하여야 한다. *M. avium subspecies paratuberculosis*는 증식에 mycobactin이 필요하며, Johne's disease가 의심되는 검체의 경우 이 증식인자가 포함된 배지(Herold's Medium)에 접종하여야 한다(표3).

표 3. 까다로운 NTM 및 주요 특성

균종	특성
<i>M. paratuberculosis</i>	인체감염은 크론병과 관련성이 높다. 소에서 발생한 만성설사와 관련된 궤양성 장염, Johnes's disease 4~8개월에 이르는 장기간의 배양기간이 필요하기도 한다. 균의 성장에 Mycobactin이 필요하며 따라서 Herold's medium에 접종하여야 한다.
<i>M. haemophilum</i>	최적의 증식에 철분이 필요하다. 따라서 피부, 뼈 및 관절 등에서 채취한 검체는 hemin, ferric ammonium citrate 또는 X-factor 검사를 위한 스트립과 같이 철분 성분이 보충된 배지에 접종하여야 한다. Chocolate agar, 5% sheep blood Colombia agar, Mueller-Hinton agar with Fildes supplement, or LJ medium containing 2% ferric ammonium citrate등이 검출을 위한 적절한 배지이다. 37°C에서 잘 자라지 못하거나 아예 자라지 못하기도 한다. 배양을 위한 최적의 온도는 30°C이다.
<i>M. genavense</i>	액체배지에서만 자라며 장기간의 배양기간이 필요하다. 최적의 증식에 철분이 필요하다. 따라서 피부, 뼈 및 관절 등에서 채취한 검체는 hemin, ferric ammonium citrate 또는 X-factor 검사를 위한 스트립과 같이 철분 성분이 보충된 배지에 접종하여야 한다.
Others	균의 증식을 위한 최적의 온도 및 균종 30°C: <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. gastri</i> 42°C: <i>M. xenopi</i>

4. 배양조건

결핵균의 배양을 위한 최적의 배양온도는 35-37°C 이다. 하지만 일부 NTM의 경우 37°C에서 잘 자라지 못하거나 아예 자라지 못하기도 한다. *M. marinum*, *M. ulcerans*에 의한 감염이 의심되는 피부 및 연부조직 검체와 *M. haemophilum*의 감염이 의심되는 경우 추가로 30°C에 배양하여야 한다. *M. xenopi*와 *M. stomatopica* 등의 배양을 위한 최적의 온도는 각각 42°C와 22°C이다.

5. 정도관리

결핵배양의 원칙에 따른 정도관리를 시행하면 되고 NTM의 도말 및 배양을 위한 특별한 정도관리는 필요하지 않다.

2. 항산균 균종동정

인제의대 신 정 환

전통적인 생화학 방법

임상적으로 감염이 의심되는 경우 가능한 모든 마이코박테리움에 대해 종 단계까지 동정하여야 한다. 기존의 생화학적 반응을 이용한 동정방법으로는 임상검체에서 흔히 검출되는 균종에 한해 동정이 가능하며, 이러한 생화학적 검사방법은 전적으로 수기에 의하며, 검사결과를 얻기까지 많은 기간이 요구되어 실제 임상미생물검사실에서 이용하기 어렵고, 현실적으로 국내 기관에서 이 방법으로 마이코박테리움을 동정하는 기관은 거의 없다.

생화학 방법을 이용한 균종 동정에 이용되는 검사방법 및 임상검체에서 분리되는 주요 균종의 특성은 아래와 같으며 자세한 검사방법, 판독, 결과의 해석 등은 1차 결핵검사지침서에 기술되어 있는 내용을 참조한다(표4).

- Arylsulfatase 검사
- Catalase 검사
- 성장속도(growth rate)와 색소생성
- Crystal violet을 뺀 MacConkey 한천평판배지에서의 증식
- 철섭취
- 염화나트륨 (NaCl) 내성
- 니아신(Niacin) 축적
- 질산염(Nitrate) 환원
- Pyrazinamidase
- Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH:T₂H) 억제
- Tellurite 환원
- Tween 80 가수분해
- Urease

표 4. 임상검체에서 분리되는 주요 NTM의 생화학적 특성

Species	색소	니아신	T ₂ H 성장	질산염 환원	Catalase	Tween 가수분해	Tellurite 환원	NaCl 내성	철섭취	Aryl- sulfatase	MAC에서 중식	Urease	Pyrazinamidase
<i>M. avium</i> complex	N	-	+	-	±	-	+	-	-	-	-/+	-	+
<i>M. shimodei</i>	N	-	+	-	-	+		-	-	-	-	-	+
<i>M. genavense</i>	N	-	+	-	+	+			-	-		+	+
<i>M. terrae</i> complex	N	-	+	+/-	+	+	-/+	-	-	-	V	-	V
<i>M. kansasii</i>	P	-	+	+	+	+	-/+	-	-	-	-	-/+	-
<i>M. marinum</i>	P	-/+	+	-	-	+	-/+	-	-	-/+	-	+	+
<i>M. simiae</i>	P	±	+	-	+	-	+	-	-	-		±	+
<i>M. asiaticum</i>	P	-	+	-	+	+	-	-	-	-		-	-
<i>M. goodii</i>	S	-	+	-	+	+	-	-	-	V	-	V	-/+
<i>M. scrofulaceum</i>	S	-	+	-	+	-	±	-	-	V	-	V	±
<i>M. szulgai</i>	S/P	-	+	+	+	-/+	±	-	-	V	-	+	+
<i>M. flavesceus</i>	S	-	+	+	+	+	-/+	±	-	-	-	+	+
<i>M. fortuitum</i> group	N	-	+	+	+	-/+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. chelonae</i>	N	-/+	+	-	±	-/+	+	V	-	+	+	+	+
<i>M. abscessus</i>	N	-		-		V		±	-	+	+	+	+
<i>M. mucogenicum</i>	N	-		V		+		-		+	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	S	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+		

핵산부합법 (Nucleic acid hybridization assays)

1. 검사원리

핵산부합법은 상보적인 단일 핵산 가닥이 적절한 환경하에서 결합하여 안정적인 이중가닥을 형성하는 원리를 이용한 방법이다. 검출하고자 하는 표적 미생물의 rRNA에 상보적인 화학발광으로 표식한 단일 가닥의 DNA 탐색자를 이용한다.

Lysing reagent와 초음파 처리를 통해 미생물로부터 rRNA를 유출시킨 후 DNA 탐색자가 표적 미생물의 rRNA와 결합하여 안정적인 DNA:RNA hybrid를 형성한다. 그리고 이렇게 결합된 DNA:RNA hybrid는 luminometer로 그 값이 측정된다. 대표적인 예로 AccuProbe system 등이 있다.

2. 검체

액체 또는 고체배지에 자란 균의 집락을 동정에 이용한다.

3. 장비 및 기구

- Water bath
- Luminometer
- Micropipette
- Vortex mixer
- Sonicator
- heat block

4. 시약 및 재료

[AccuProbe system]

1) Reagent kit

- Reagent 1 (specimen diluents)
- Reagent 2 (probe diluents)

- Reagent 3 (selection reagent)

2) Detection reagents

- Reagent 1 (0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid)
- Reagent 2 (1 N NaOH)
- Equipment and Leader luminescence

3) 기타

- 1 μ L 플라스틱 루프, 수조, heating block, 파이펫, vortex mixer, 초음파발생장치
- 양성 및 음성대조균 균주

5. 검사과정

1) 검체의 준비

- (1) 100 μ L의 reagent 1과 100 μ L의 reagent 2를 lysing reagent tube에 넣는다. 이때 액체배지를 대상으로 검사할 때에는 reagent 1을 lysing tube에 넣지 않는다.
- (2) 고체배지에서 자란 균주를 이용할 경우 1 μ L의 일회용 플라스틱 루프 또는 점종 막대를 이용하여 집락을 분리하며, 고체배지가 함께 분리되지 않도록 주의해야 한다.
- (3) 액체배지를 이용할 경우 100 μ L의 배지 현탁액을 lysing reagent tube에 넣는다.
- (4) Lysing tube의 뚜껑을 닫고 vortex한다.

2) 검체의 용해 (lysis)

- (1) 15분간 초음파 처리한다.
- (2) Lysing reagent tube를 10분간 $95^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 heating block에 둔다.

3) 핵산부합

- (1) Lysing reagent 내의 100 μ L의 용해된 검체를 probe reagent tube로 옮긴다.
- (2) Probe reagent tube의 뚜껑을 닫고 15분간 60°C 의 water bath에 둔다. 이 때 온도가 적절하게 유지되고 있는지를 확인하는 것이 중요하다.

4) 선택 및 검출

- (1) Water bath에서 probe reagent tube를 꺼내 각 튜브에 reagent 3을 300 μ L넣은 후 뚜껑을 닫고 vortex한다.
- (2) Probe reagent tube를 60°C의 온수조에 둔다. 이 때 시간은 검사 대상 probe에 따라 차이가 있다. (*M. kansasii* probe: 8분, *M. avium* complex 및 *M. gordonae* probe: 5분)
- (3) 온수조에서 probe reagent tube를 꺼내어 5분 이상 실온에 둔다. 그리고 1시간 이내에 luminometer에서 결과를 판독한다.

6. 결과해석과 보고

- (1) RLU값이 30,000이상이면 양성으로 판정하고, 30,000미만이면 음성으로 판정하되, 20,000과 30,000 사이인 경우 재검하여야 한다.
- (2) 검사한 키트의 종류에 따라 각 검사한 균종에 대해 양성으로 보고 한다.

7. 정도관리

- 양성 및 음성대조균을 각 사용일에 검사하여 확인하여야 한다. 다음의 균주에 대해 환자의 검체와 동일한 방법으로 검사하여야 한다.

- (1) *M. avium* complex culture identification test
 - 양성대조균: *M. avium* ATCC 25291
 - 음성대조균: *M. tuberculosis* ATCC 25177
- (2) *M. gordonae* complex culture identification test
 - 양성대조균: *M. gordonae* ATCC 14470
 - 음성대조균: *M. scrofulaceum* ATCC 19981
- (3) *M. kansasii* complex culture identification test
 - 양성대조균: *M. kansasii* ATCC 12478
 - 음성대조균: *M. tuberculosis* ATCC 25177

- Leader instrument의 측정 수행능 평가를 위해 tritium standard가 사용되며 기대치에 대한 측정치의 비가 0.95와 1.05사이에 있어야 한다.
- 정도관리결과: 양성대조균의 측정값은 30,000 relative light units (RLU)이상이어야 하고 음성대조균의 측

정값은 10,000 RLU 미만이어야 한다.

8. 제한점과 문제해결

- (1) 비결핵항산균 중 *M. avium* complex, *M. gordonae*, 및 *M. kansasii* 등을 동정할 수 있다.
- (2) 고체 또는 액체배지에서 자란 신선한 균주를 이용하여 검사하여야 한다.
- (3) 임상검체에서 직접 검출 및 동정하는데 이용할 수는 없다.

Line Probe Assay

Line probe assay는 PCR과 reverse hybridization을 혼합한 DNA strip assay이며 다음의 검사과정을 거친다.

- 표적으로 하는 염기서열을 Biotinulated primer를 이용하여 PCR 방법으로 증폭시키고,
- 각각의 종에 특이적으로 반응하는 immobilized, membrane-bound probe에 hybridization시킨 후
- 효소반응을 이용하여 색의 변화를 보이게 한다.
- 최종적으로 밴드의 패턴을 육안으로 관찰하고, 각 제조회사의 해석표를 통해 균종을 동정한다.

검사실에서 이용할 수 있는 상품화된 키트로는 INNO-LiPA Mycobacteria v2 assay (Innogenetics, Ghent, Belgium), GenoType Mycobacteria CM/AS test (HAIN Lifescience, Nehren, Germany), AdvanSure Mycobacteria GenoBlot Assay (LG Lifescience, Korea) 등이 있다. 본 지침에서는 국내에서 사용빈도가 높은 두 시약에 대해서 기술하였다.

GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience)

1. 검사원리

GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteria)은 DNA-strip기술을 이용하여 마이코박테리아의 검출 및 동정이 가능하며 해당 균종은 다음과 같다: *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* complex, *M. xenopi*

전체 검사과정은 배양된 균주로부터 DNA의 추출, biotinylated primers를 이용한 다중증폭(Multiplex amplification), 역핵산부합(reverse hybridization)의 세 단계로 진행된다.

GenoType Mycobacterium AS (Additional Species)은 GenoType Mycobacterium CM과 동일한 원리 및 방법으로 진행되며 GenoType Mycobacterium CM에서 균종이 동정되지 않는 경우 추가로 시행 가능하다. 동정 가능한 균종은 다음과 같다: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*

2. 검체

액체 또는 고체배지에 자란 균의 집락

3. 장비 및 기구

4. 시약 및 재료

- 특이 프로브로 흡착된 멤브레인 스트립
- Primer, nucleotide, dye가 혼합된 Primer Nucleotide mix
- Denaturation 용액
- 교잡반응액 (Hybridization buffer)
- 강력 세척액 (Stringent wash solution)

- 행균 세척액 (Rinse Solution)
- Conjugate 농축액
- Conjugate 완충액(Buffer)
- Substrate 농축액
- Substrate 완충액 (Buffer)

5. 검사과정

1) 검체의 준비

- ① 액체배지 또는 고체배지에 배양된 균주
- ② 환자의 임상검체를 직접 이용한 검사는 불가능하다.
- ③ 세균을 불활성화시키기 위해 검체를 95°C에서 20분 이상 열을 가한다.

2) 핵산추출

- ① 고체배지의 경우 루프를 이용하여 세균을 긁어 모은 후 300 μ L의 증류수를 섞는다.
- ② 액체배지의 경우 1 mL의 액체배지를 이용하여 10,000 g에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 남은 침전물에 100-300 μ L의 증류수를 섞는다.
- ③ 95°C에서 20분간 반응시킨다.
- ④ 초음파로 15분간 처리한다.
- ⑤ 5분간 스피ندا운한 후 상층액 5 μ L를 PCR에 이용한다.

3) PCR반응

- ① PCR 튜브에 증폭혼합물(amplification mix)을 준비한다.
- ② 증폭혼합물에 5 μ L의 DNA solution을 혼합한다.
- ③ PCR을 시행한 후, 전기영동으로 결과를 확인한다.

4) 핵산부합 (Hybridization)

- ① 각 튜브에 Denaturation 용액 20 μ L을 분주한다.
- ② PCR반응 후 증폭된 DNA 20 μ L를 넣은 후 파이프트로 잘 섞은 후 5분간 실온에 둔다.

- ③ 1 mL의 미리 가온한 Hybridization buffer를 조심해서 각 well에 분주한다.
- ④ 각 well에 스트립을 놓는다.
- ⑤ 트레이를 Shaking water bath에 넣고 45°C에서 30분간 반응시킨다.
- ⑥ Hybridization buffer를 완전히 제거한다.
- ⑦ 각 스트립에 Stringent wash solution(강력세척용액) 1 mL를 넣고 Shaking water bath에서 45°C에서 15분간 반응시킨다.
- ⑧ 이후 모든 단계는 실온에서 반응한다.
- ⑨ Stringent wash solution을 완전히 제거한다.
- ⑩ Shaking platform에서 1분 동안 1 mL의 Rinse solution로 각 스트립을 세척한다.
- ⑪ 각 스트립에 1 mL의 희석된 conjugate를 넣은 후 shaking platform에서 30분간 반응시킨다.
- ⑫ 용액을 제거한 후 shaking platform에서 1 mL의 rinse solution으로 1분 동안 스트립을 2회 세척하고 1분간 1 mL의 증류수로 1회 세척한다.
- ⑬ 각 스트립에 1 mL의 희석된 substrate를 더하고 shaking 없이 암소에서 반응시킨다.
- ⑭ 증류수로 2번 세척하여 반응을 중지시킨다.
- ⑮ Tweezer를 이용하여 트레이에서 스트립을 빼내고 2장의 흡수지 사이에 넣어 말린다.

5. 결과해석과 보고

- 4에서 17까지의 각 프로브에 밴드가 뜨면 양성으로 판정한다.
- 양성으로 확인된 프로브 번호의 조합을 제공된 sheet와 비교하여 균종을 동정한다.

6. 정도관리

각 스트립에 대조군의 프로브가 포함되어 있으며 다음과 같다.

- CC (conjugate control): conjugate의 결합과 substrate이 적절하게 수행되었음을 확인하기 위하여 사용된다.
- UC (Universal control): 모든 알려진 마이코박테리아와 그람양성 세균 중 G+C의 비율이 높은 세균을 검출하기 위한 것이다. CC와 UC는 양성인데 특이 종을 위한 프로브에 음성인 경우 본 키트에서 제공되지 않는 균종일 가능성이 있고 다른 방법으로 동정하여야 한다.
- GC (Genus control): 마이코박테리움속에서 양성을 보이며 반응강도는 종에 따라 차이가 있다.

7. 제한점과 문제해결

세균 유전자의 다양성에 의해 일부 균종 또는 아종의 경우 검출이 되지 않을 수 있다.

고체 또는 액체배지에서 자란 신선한 균주를 이용하여 검사하여야 한다. 임상검체에서 직접 검출 및 동정하는데 이용할 수는 없다.

AdvanSure Mycobacteria GenoBlot Assay (LG Lifescience)

1. 검사원리

원튜브 네스티드 다중 비대칭 중합효소연쇄반응 (one-tube nested multiplex asymmetric PCR)을 이용한 역교잡반응 라인블롯법 (reverse-hybridization line blot assay)이다. 마이코박테리아의 internal transcribed spacer (ITS) 부위의 염기서열을 대상으로 PCR 증폭 산물과 membrane에 고정된 각 종에 특이적인 oligonucleotide probe를 교잡반응시킴으로써 염기서열이 알려진 70여종의 마이코박테리아를 검출할 수 있으며 23종의 마이코박테리아를 동정할 수 있다.

중합효소연쇄반응동안 결핵균 및 비결핵항산균의 ITS부위가 비대칭적인 PCR방법으로 바이오틴 부착 마이코박테리아 속 프라이머를 이용하여 증폭됨으로써 최종 바이오틴 라벨 단일 가닥 타겟 DNA (biotin-labeled single-stranded target DNA)가 생성되며 이 때 내부대조균도 동시에 형성된다. 동정 가능한 마이코박테리아 종은 다음과 같다: *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. celatum*, *M. marinum* + *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. lentiflavum* + *M. genavense*, *M. xenopi*, *M. smegmatis*, *M. malaoense*, *M. gastri*, *M. flavescens*, *M. vaccae*, *M. fortuitum* complex, *M. terrae* complex

2. 검체

- 액체 또는 고체배지에 자란 균의 집락
- 객담, 기관지 세척액, 뇌척수액, 소변, 조직, 전혈 등의 임상검체

3. 장비 및 기구

4. 시약 및 재료

- 추출완충용액 (Extraction buffer): Ion exchange resin
- 시료전처리액 1 (Pre-treatment I X10): NaOH
- 시료전처리액 2 (Pre-treatment II): 1.5 M NaCl, 0.1 M NaH₂PO₄
- 2X PCR 혼합액, Primer mixture, 및 양성 및 음성 대조균
- 프로브 흡착 스트립 및 교잡반응액(Hybridization buffer)

- 강력 세척액(Stringent wash solution) 및 헹굼 세척액(Rinse Solution)
- 효소접합용액(Enzyme Solution): Streptavidin conjugated alkaline phosphatase in Tris buffer
- 발색 용액(Substrate Solution)

4. 검사과정

1) 검체의 준비

- ① 배양된 균주와 객담, 기관지세척액, 뇌척수액, 소변, 조직, 체액 및 전혈 등의 검체
- ② 단기간(1주 이내) 보관 시에는 -20°C에 보관하며 장기보관 시에는 -20°C 이하에 보관한다.

2) 검체의 전처리

- ① 배양된 균주는 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남아 있는 침전물을 DNA 추출에 사용한다.
- ② 객담 또는 기관지 세척액은 전처리액 1과 섞은 후, 원심분리하고 상층액을 제거한 후 남아 있는 침전물을 DNA 추출에 사용하며, 뇌척수액, 소변 등 각종 체액은 원심분리하고 상층액을 제거한 후 전처리액 첨가한 후 남아있는 침전물을 DNA 추출에 사용한다.

3) 핵산추출

- ① 전처리 과정 후 남아 있는 침전물에 1 mL의 조제된 시료 전처리액 2를 첨가한다.
- ② 10초간 vortex한 후 13,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하고 상층액을 제거한다.
- ③ 추출완충용액을 잘 섞은 후 50 μ L를 침전물에 첨가한다.
- ④ 100°C에서 20분간 가열한 후 원심분리하고 분리된 상층액을 PCR에 사용한다.

4) PCR반응

- ① 시발체 혼합액 5 μ L와 마이코박테리아 DNA를 첨가한 후 PCR을 시행한다.
- ② 핵산부합(Hybridization)반응 수행 전까지 -20°C이하에 보관한다.

5) 핵산부합 (Hybridization)

- ① 프로브 흡착 스트립의 멤브레인에 준비한 핵산부합 혼합액 270 μ L를 분주한다.
- ② 핵산부합반응기의 덮개를 닫고 55°C 핵산부합반응 챔버에 넣고 30분간 교반시킨다.

- ③ Pre-warming 한 후 강력 세척액(Stringent wash solution) 250 μ L를 스트립에 분주하여 55°C에서 15분 동안 9 rpm으로 수직 교반 반응을 실시하여 세척한다.
- ④ 헹굼 세척액 (Rinse solution) 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 1분간 9 rpm으로 수직교반반응을 실시하여 세척한다.
- ⑤ 세척 반응이 끝난 스트립의 반응액을 vacuum suction하여 제거한다.
- ⑥ 효소접합용액 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 30분 동안 9 rpm으로 수직 교반 반응을 실시하여 세척한다.
- ⑦ 효소접합반응이 끝난 스트립의 반응액을 vacuum suction하여 제거한다.
- ⑧ 헹굼 세척액 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 1분 동안 9 rpm으로 수직 교반반응을 실시하여 세척한다.
- ⑨ 멸균증류수 250 μ L을 스트립에 분주하여 상온에서 1분 동안 9 rpm으로 수직 교반반응을 실시하여 세척한다.
- ⑩ 세척반응이 끝난 스트립의 반응액을 vacuum suction하여 제거한다.
- ⑪ 발색용액(substrate solution) 250 μ L을 스트립에 분주한 후, 빛을 차단한 조건하에서 상온에서 10분동안 9 rpm으로 수직 교반반응을 실시하여 세척한다.
- ⑫ 발색 반응이 끝난 스트립을 멸균증류수 250 μ L로 헹구어 남아 있는 발색용액 및 침전물을 vacuum suction하여 완전히 제거한다.
- ⑬ 멤브레인 스트립을 헤어드라이기를 사용하여 신속하게 건조시키거나 공기 중에서 자연 건조시킨 후 AdvaSure GenoLine Scan 프로그램을 이용하여 수치화 분석을 하거나 Test reference guide 또는 Data sheet를 이용하여 육안으로 결과를 판독한다.

5. 결과해석과 보고

각 프로브의 특정 균종에 해당하는 밴드가 뜨면 양성으로 판정한다.

6. 정도관리

각 스트립에 대조군의 프로브가 포함되어 있으며 다음과 같다.

- CC (conjugate control): 접합반응 대조군으로 실험과정 중 효소접합 반응과 발색반응이 적절하게 수행되었음을 확인하기 위하여 사용된다.
- IC (Internal Control): PCR반응이 저해작용 없이 적절하게 수행되었음을 확인하기 위하여 사용된다. 결핵

균의 ITS부위를 사용한다.

- GPC (Genus positive control): 23개의 구분가능한 마이코박테리아의 타입뿐만 아니라, 기타 50여종의 다른 타입에서도 양성으로 나타난다.
- GNC (Genus negative control): 핵산부합반응 및 세척 반응이 적절하게 이루어짐을 평가하기 위함이다.

7. 제한점과 문제해결

일부균주의 경우 염기서열의 유사성으로 인해 KAN, TERC, L-G, FOR SME, FLA 등의 다른 프로브에도 약한 양성반응을 보일 수 있으며 실예는 다음과 같다.

- 1) *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, 및 *M. gordonae* 양성인 경우 *M. kansasii* 프로브에 약한 위양성 반응이 생길 수 있다.
- 2) *M. celatum* 양성인 경우 *M. terrae* complex에, *M. simiae*는 *M. lentiflavum*/*M. genavense*에, *M. smegmatis*는 *M. fortuitum* complex에, *M. fortuitum*은 *M. smegmatis*에 약한 위양성 반응이 생길 수 있다. 하지만, 위와 같은 교차반응의 경우 역으로의 교차반응은 생기지 않는다.
- 3) *M. marinum*과 *M. ulcerans*, *M. lentiflavum*과 *M. genavense*는 두 종이 서로 구분이 되지 않으므로 균종의 동정을 위해 추가적인 다른 방법을 고려하여야 한다.

PCR Restriction Enzyme Analysis (PRA)

1. 검사원리

핵산증폭과 제한효소절단을 이용한 방법으로 *hsp65* 유전자를 이용한 441bp의 Telenti fragment가 유용한 방법으로 알려져 있다. PRA방법은 증식속도, 영양요구도 등과 무관하며, 기본적으로 PCR을 시행하는 기관이면 추가적인 장비가 필요하지 않고, 한 번의 검사만으로 다수의 균종을 동정할 수 있다는 장점이 있다. 하지만, 아직까지 상품화된 *hsp65* 유전자를 이용한 PRA법은 없어 모두 검사실내에서 자체적인 데이터베이스를 구축하고, 검사법을 검증해야 한다는 단점이 있다. 국내에서도 *tpoB* 유전자부위를 이용한 PRA방법(Myco-ID, M&D, Korea)이 개발되어 검사실에서 이용되고 있다. 이는 미코박테리아와 일부 aerobic actinomycetes를 함께 동정할 수 있는 장점이 있으나, 기존의 *MspI* 효소를 이용한 결과 동정이 되지 않는 경우 *HaeIII*, *AluI*, *BstEII* 등 다양한 제한효소를 추가로 검사해야 하는 단점이 있다.

2. 검체

- 액체 또는 고체배지에 자란 균의 집락을 동정에 이용한다.

3. 장비 및 기구

4. 재료와 시약

[Myco-ID]

1) PCR reagents

- 2X PCR premix
- PCR positive control DNA
- PCR and PRA DNA size marker
- *MspI* (10 U/ μ L) and 10X *MspI* buffer
- *HaeIII* (10 U/ μ L) and 10X *HaeIII* buffer
- Primer I and Primer II
- Nest Primer I and Primer II
- DNA extraction solution and 8-MOP

2) TBE agarose gel

- 2% TBE agarose gel & 4% Metaphor TBE agarose gel
- 5X TBE gel electrophoresis buffer

4. 검사과정

1) DNA 분리

(1) 고체배양

- ① 고체 배양균을 loop로 떼어낸 후 준비된 DNA extraction solution 100 μ L에 잘 풀고 1분간 vortex한다.
- ② Heating block에서 100°C, 10분간 가열한 후, 13,000 rpm에서 3분간, 실온에서 원심분리한다.
- ③ 상층액 3 μ L를 취해 PCR을 수행한다.

(2) 액체배양

- ① 액체배지 1 mL를 취한다.
- ② 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한다.
- ③ 상층액을 완전히 제거한다.
- ④ 멸균된 증류수 1 mL에 균액을 잘 풀어 vortex한다. 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 후 상층액을 완전히 제거한다. 멸균된 증류수로 1회 더 반복한다.
- ⑤ DNA extraction solution 100 μ L를 넣고 1분간 vortex한다.
- ⑥ Heating block에서 100°C, 10분간 가열한 후, 13,000 rpm에서 3분간, 실온에서 원심분리한다.
- ⑦ 상층액 3 μ L를 취해 PCR을 수행한다.

2) PCR 및 전기영동

(1) PCR mixture 준비

아래의 시약들을 PCR tube에 넣고 미리 94°C로 예열된 PCR기기에서 아래의 조건으로 PCR을 수행한다.

- 〈PCR mixture준비: 총 50 μ L〉
- 2X PCR premix(25 μ L)
 - Primer I (1 μ L)
 - Primer II (1 μ L)
 - 검체 DNA 또는 PCR positive control DNA (3 μ L)
 - 멸균된 증류수 (20 μ L)

〈PCR 조건〉

· Predenaturation	94°C	5분	1cycle
· Denaturation	94°C	20초	35cycle
· Annealing	58°C	40초	
· Elongation	72°C	60초	
· Final Elongation	72°C	10분	1cycle

(2) 전기영동

- ① 반응액을 quick-spin한다.
- ② 반응이 끝난 PCR tube에 1 μ L의 8-MOP 용액을 넣는다.
- ③ 검체의 PCR산물 3-5 μ L, PCR size marker는 5 μ L를 제공된 2% TBE agarose gel에 점적한다.
- ④ 6 V/cm으로, PCR size marker의 두 번째 loading dye가 gel의 2/3부분에 내려올 때까지 진행시킨다.
- ⑤ Gel을 EtBr로 염색 후, 수돗물로 탈색한다.
- ⑥ UV transilluminator를 이용하여 전기영동 결과를 확인한다.

(3) 제한효소 반응 및 전기영동

- ① 1.5 mL tube에 제한효소 반응액을 준비한다.
- ② 반응액을 tapping 또는 약하게 vortex하여 quick-spin한 후 37°C 항온수조에서 90분간 반응을 한다.
- ③ 반응액을 quick-spin한다.
- ④ PRA DNA size marker (10 μ L)와 제한효소 반응액(10 μ L)을 4% metaphor TBE agarose gel에 점적한다.
- ⑤ 100V에서 40-60분 간 전기영동 탱크를 얼음에 방치한 상태로 전기영동한다.
- ⑥ Gel을 EtBr로 10분간 염색한 후, 수돗물로 10분간 탈색한다.
- ⑦ UV transilluminator를 이용하여 전기영동 결과를 확인한다.
- ⑧ 미코박테리아 및 노카디아 동정 알고리즘 표를 이용하여 균을 동정한다.

5. 결과해석과 보고

미코박테리아 및 노카디아 동정 알고리즘표에 따라 균종을 동정하고, 해당균종을 보고한다.

6. 정도관리

양성 및 음성대조균을 각 사용일에 검사하여 확인하여야 한다.

7. 제한점 및 문제해결

$MspI$ 을 이용한 동정에서 2가지 또는 그 이상의 균종이 서로 구분이 되지 않는 경우가 있다. 이 때에는 동정알고리즘표에 제시되어 있는 해당 제한효소를 사용하여 추가로 검사하여야 한다.

지방산 분석 (Mycolic Acid Analysis)

마이코박테리움의 각 종마다 세포벽의 지방산 구성이 다양하며 이러한 특징은 오랫동안 진단적 목적의 종 동정에 이용되어 왔다. 특히 High performance liquid chromatography (HPLC)은 이전의 생화학적 동정방법에 비해 마이코박테리움을 매우 빠르고 정확하게 동정할 수 있게 하였다. 미국 CDC에서는 HPLC를 이용한 동정을 수행함에 있어 적절한 검사방법 및 각 균종 동정을 위한 패턴에 대한 표준검사지침을 제작하여 배포하고 있다.

유전자 염기서열분석 (Gene Sequencing)

1. 검사원리

유전자의 부분 염기서열분석 방법은 마이코박테리움의 균종 동정을 위한 가장 믿을 수 있는 방법 중 하나이다. 16S rRNA gene, ITS, *hsp65*, *ipoB* 등 다양한 유전자가 이용되는데, 그 중 16S rRNA gene은 미생물동정에 가장 처음부터 사용된 유전자이고, 새로운 종이 보고될 때마다 가장 먼저 공공 데이터베이스에 그 정보가 등록되기 때문에 가장 중요한 유전자로 여겨진다.

염기서열분석을 이용한 마이코박테리움의 동정기준에 대해서는 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)의 Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing: Approved Guideline MM18-A에 별도로 기술되어 있으며 주요내용은 다음과 같다.

[CLSI 주요기준]

대부분의 마이코박테리아의 동정은 16S rRNA gene의 5' 끝부분을 이용하는 것으로 충분하다. 동정에 이용되는 주요 부분은 hypervariable region A와 B에 국한되는데, 이는 *E. coli*의 129-267, 430-500의 위치에 해당한다.

많은 종에서 이 부위의 염기서열분석만으로 동정이 명확하지 않을 수 있다. 이는 연관성이 매우 높은 종 (Closely related species)은 단지 몇 개의 염기서열에서만 차이를 보이기도 하고, 일부 종은 16S rRNA gene 염기서열전체가 일치하기도 하기 때문이다. 이런 경우 다른 표적 DNA 또는 생화학반응을 동정에 이용 가능하다.

반대로 *M. avium*, *M. fortuitum* 및 *M. goodii* 등과 같이 일부 종의 경우 종내 이질성 (intraspecies heterogeneity)을 보이는 경우가 있으며, 공공 데이터베이스에 등재된 염기서열의 이용 시 결과의 해석에 주의하여야 한다.

〈16S rRNA gene을 이용한 염기서열분석의 동정알고리즘〉

- 비교 균종과 염기서열이 100%일치: 특정 종으로 보고한다.
- 비교 균종과 염기서열이 99.0%~99.9%일치: 속명으로 보고하며, 특정 종과 가장 연관성이 높음을 명시한다. ([Genus], most closely related to [species])
- 비교 균종과 염기서열이 95%이상일치: 16S rRNA gene 염기서열분석으로는 동정이 불가능하며 마이코박테리움과 연관성이 높음으로 보고한다.
- 기타: 100% 일치조건이 필수적이긴 하지만, 다른 부위에서 몇 개의 염기서열 불일치가 있더라도 종단위의 동정결과는 수용 가능하다.

2. 마이코박테리아의 동정에 유용한 주요 유전자 및 특징

1) 16S rRNA gene

일상적인 균종 동정을 위해서 1,500bp의 16S rRNA gene 전체에 대한 염기서열분석은 실용적이지도 않고, 또 필요하지도 않다. 약 500bp 크기의 부분염기서열분석만으로 균종 동정은 대부분 가능하며, 마이코박테리움의 종 동정에 유용한 hypervariable A와 B부분을 모두 포함하게 된다. 하지만, 일부 균종은 hypervariable A, B 부분 또는 전체 16S rRNA gene의 염기서열이 일치하여 균종 동정에 어려움이 있으며 *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae*, *M. abscessus*와 *M. kansasii* 및 *M. gastri* 등이 이에 해당한다. 이런 경우 정확한 균종동정을 위해 ITS, *hsp65*, *rpoB* 등의 다른 유전자를 이용한 동정이 필요하다.

2) ITS gene

16S rRNA와 23S rRNA의 사이에 위치하는 spacer sequence로 약 200bp에서 330bp 정도의 크기여서 분석이 매우 용이하다. 현재까지 다양한 프라이머가 소개되어 이용되고 있다. 균종간 염기서열의 변이가 커서 종동정에 유용하다. 하지만 신속증식항산균과 *M. simiae*와 *M. xenopi*와 같은 slow growing mycobacteria에서 둘 이상의 염기서열 변이가 보고된 바 있으며, *M. marinum*과 *M. ulcerans*의 경우 16S rRNA gene과 마찬가지로 ITS에서도 염기서열이 일치하여 종 동정이 불가능하다.

3) *hsp65* gene

PRA법에 사용하는 부위와 동일한 부위에 대해 염기서열 분석한 결과를 균종동정에 이용하게 된다. *hsp65* gene의 440bp 분절이 흔히 이용되며, 유전적으로 매우 상동한 균종의 동정에 특히 유용하다. 16S rRNA gene의 이용 시 동정에 어려움이 있는 *M. marinum*과 *M. ulcerans*의 구분, *M. gastri*와 *M. kansasii*의 구분 등에 특히 유용하며, *M. avium* subsp. *avium*과 *M. avium* subsp. *hominissuis*의 감별에도 일부 이용된다.

4) *rpoB* gene

대상 유전자는 약 3,600bp의 크기로 해당연구자 마다 다양한 위치 및 다양한 크기로 분석한 결과를 제시하고 있다. 따라서 동일한 유전자를 대상으로 연구를 진행하긴 하였지만, 분석 결과에 따라 차이를 보이기도 하며, 현재까지 전체 NTM을 대상으로 한 연구결과를 찾기도 어려운 단점이 있다.

3. 16S rRNA 염기서열분석에 유용한 데이터베이스 및 특징

염기서열 결과를 이용하여 균종을 동정하기 위해서는 데이터베이스의 이용은 필수적이다. 가장 널리 이용되는 데이터베이스로는 GenBank가 있다. 가장 많은 염기서열 데이터를 보유하고 있고 무상으로 이용 가능한 장점이 있는 반면에 검증되지 않은 염기서열이 다수 포함되어 있고, 배양이 되지 않는 세균의 염기서열이 등록 가능하고 연구자의 성향에 따라 분석된 데이터의 풀림 현상이 심하여 유사한 다른 종의 숨김 현상이 발생하는 단점이 있다.

그 외 널리 알려진 데이터베이스로는 Ribosomal Database Project (RDP), Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM), EzTaxon-e, MicroSeq, SmartGene Integrated Database Network System (SmartGene IDNS) 등이 있다.

RIDOM과 MicroSeq은 균주은행에 등록된 세균의 16S rRNA gene을 직접 염기서열 분석한 후 그 결과를 바탕으로 데이터베이스를 구축하였다. 따라서 매우 신뢰성 있는 데이터를 제공해 준다. 하지만 RIDOM의 경우 *Neisseriaceae*, *Moraxellaceae* 및 *Mycobacterium* 등 제한된 균만을 대상으로 단점이 있다.

MicroSeq은 임상에서 흔히 검출되는 다수의 균주를 대상으로 직접 분석한 자료를 보유하고 있고, base calling, alignment, 유사성 확인, 최종 균종의 확인에 이르기까지 일련의 과정을 바로 확인할 수 있어 경험이 많지 않은 검사자가 이용하기에 편리하고, 이미 십수년 전부터 이에 대한 연구평가 결과가 보고되어 있어 다양한 균에서의 동정능이 검증되어 있는 장점이 있다. 따라서 일상적인 검사용도로의 이용에는 매우 편리하지만, 비싼 데이터베이스를 구매해야만 사용할 수 있고, 현재까지 알려져 있는 Type strain 수와 비교하여 등록되어 있는 세균의 종이 적어 균종 보고를 위한 연구목적으로 이용하기에는 한계가 있다.

RDP, EzTaxon-e, SmartGene IDNS 등은 유전자 은행에 있는 데이터를 수집하여 모아놓은 것으로 유전자 은행의 결과에서 생길 수 있는 단점, 특히 잘못된 염기서열결과가 포함되어 있을 가능성이 여전히 존재함을 알고 있어야 한다. RDP와 EzTaxon-e은 무상으로 이용 가능한 반면 SmartGene IDNS는 이용료를 지불하여야 한다. RDP는 염기서열의 비교분석 시 Type strain의 유무, 배양유무, 크기, 질 등을 별도로 선택하여 진행할 수 있는 장점이 있고, EzTaxon-e의 경우 거의 모든 Type strain이 포함되어 있으며, 운영책임자가 미생물 분류학회지의 책임편집위원으로 새롭게 등재되는 신종이 항상 빠르게 업데이트되는 장점이 있는 반면 Type strain 위주로 구성되어 있어 종내 염기서열변이가 큰 균종의 경우 균종 동정에 어려움을 겪게 되는 단점이 있다.

3. 비결핵항산균 감수성 검사

울산의대 성 흥 섭

비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)은 결핵균과 나병균을 제외한 항산균을 말한다. NTM으로 인한 질환, 역학, NTM 폐질환의 진단기준, 도말, 배양과 동정 등에 대해서는 2011년 1차 결핵진료지침의 부록 편과 2012년 2차 결핵진료지침을 참고한다.

NTM 약제 감수성 검사는 (1) 임상적으로 의미 있는 분리주이면서, (2) 임상적으로 유용한 항균제에 다양한 감수성을 보이거나 획득 내성을 보일 수 있는 경우 시행한다.¹

호흡기 검체에서 NTM이 분리되었을 때 임상적 의의는 일반적으로 2007년 미국흉부학회(American Thoracic Society, ATS)와 미국감염학회(Infectious Diseases Society of America, IDSA)의 NTM 폐질환 진단기준을 따르며 자세한 내용은 2011년 1차 결핵진료지침의 부록 편에 잘 설명되어 있다.¹ 간단하게 미생물학적 기준을 설명하면 다음과 같다: 도말 결과와는 상관없이 (1) 최소한 2회 객담 배양 양성이거나, (2) 최소한 기관지세척액 1회에서 배양 양성인 경우, (3) 경기관지 폐생검 등 조직배양에서 양성이거나 또는 조직검사에서 육아종 등 항산균 감염의 병리학적 증거가 있으면서 1회 이상 객담 또는 기관지 세척액에서 배양이 양성이어야 한다. 혈액, 뇌척수액, 조직 등 정상적으로 무균 검체에서 분리된 NTM은 임상적으로 의미가 있다.

M. avium complex (MAC), *M. kansasii*, *M. marinum* 및 신속성장형 비결핵항산균(rapidly growing mycobacteria, 신속성장형 NTM)에 대해서는 충분한 감수성 자료와 임상적 경험이 있기 때문에 감수성 검사 지침 수립이 가능하였다. MAC, *M. kansasii*, *M. marinum*을 제외한 다른 완속성장형 비결핵항산균(slowly growing mycobacteria, 완속성장형 NTM)도 사람에서 감염을 일으킬 수 있으나, 감수성 검사 결과와 임상적 연관성간의 연구 자료가 드물다. NTM 균종별로 감수성 검사가 필요한 항균제 종류는 미국흉부학회(American Thoracic Society, ATS)의 의견을 반영하여 정하였다.¹

1. 검사 원리

NTM 감수성 검사의 표준법은 액체배지미량희석법(broth microdilution)이다.² 희석법에서 얻어진 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 감염이 있는 부위에서 감염균의 성장을 억제하는 데 필요한 항균제의 농도를 의미한다. 실제 균의 정확한 MIC는 균이 성장한 가장 높은 항균제 농도와 균이 성장하지 않은 가장 낮은 항균제 농도 사이에 존재한다. 예를 들어 두 배수 연속 희석한 항균제 패널에서 MIC가 16 $\mu\text{g/mL}$ 이면 실제 균의 정확한 MIC는 8 $\mu\text{g/mL}$ 과 16 $\mu\text{g/mL}$ 사이가 될 것이다. 액체배지희석법은 잘 통제된 조건에서도 반

복 검사 시 동일한 최종점(end point)을 보이지 않을 수 있으므로, 허용된 오차 범위는 최종점 $\pm$ 한 단계 희석농도이다. 이런 오차 범위를 줄이기 위해 본 지침서에서 기술하는 정도관리 방법과 검사 지침을 잘 따라야 한다. 검사한 항균제 농도 중 가장 낮은 농도에서 균이 자라지 않았을 경우 “≤해당 농도”로 보고한다.

2. 검체

- 추천되는 검체: 한천배지에 순수 배양된 NTM 집락
- 사용 가능한 검체: 계란배지(Lowenstein-Jensen 배지 또는 오가와 배지)에 순수 배양된 NTM 집락

아직까지 항균제 감수성 검사를 위해 NTM 집락이 관찰된 지 몇 일 이내의 균 집락을 사용해야 하는지에 대한 지침은 없다. 결핵균은 일반적으로 14-15일 이내의 신선한 집락을 사용하기를 권장하고 있다.³ 따라서 완속성장형 NTM인 경우 처음 집락이 관찰된 지 14일 이내의 집락을, 신속성장형 NTM인 경우 처음 집락이 관찰 가능한 지 7일 이내의 집락을 사용하도록 한다.

3. 장비 및 기구

- 배양기(incubator)
- 보텍스 교반기(vortex mixer)
- 멀티피펫(multi-pipette), 피펫
- 멸균된 3 mm 크기의 유리 구슬
- 96 well 플레이트 (항균제 트레이(tray)를 자가 제작할 경우)
- 백금이
- 돌려 막는 뚜껑이 있는 5 mL, 10 mL, 50 mL 튜브
- 멸균된 소형 공이(micro-pestle)
- 플라스틱 홈통(trough)
- 공기가 통하는 접착성 플라스틱 덮개



그림 1. 공이. (좌) Eppendorf 튜브용, (우) 10 mL 튜브용.

4. 시약 및 재료

- 0.5 McFarland 탁도 표준액: 1.175% barium chloride dihydrate ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.05 mL과 1% sulfuric acid (H_2SO_4) 9.95 mL을 혼합하여 제작
- 멸균된 면봉
- 멸균 증류수
- 양이온 보정 Mueller-Hinton 액체배지(cation-adjusted Mueller-Hinton broth, CAMHB)
- 영양한천배지: 5% 면양혈액한천이나 trypticase soy 한천
- OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase) 용액: 완속성장형 NTM 감수성 검사 시
- 상업화된 동결건조 항균제 플레이트: 상업화된 시약을 사용할 경우
- 항균제: 자가 제조 항균제 트레이를 사용할 경우 필요하며 각 NTM 균종에서 감수성 검사가 필요한 항균제 종류를 기술함

5. 검사 과정

1) 상품화된 동결건조 패널을 사용할 경우의 접종액 제조

- ① 한천배지에 충분히 자란 집락을 멸균된 면봉으로 쓸듯이 문힌다.

- ② 멸균된 유리 구슬 7-10개가 든 4.5 mL 멸균 증류수 튜브에 균을 묻힌 면봉을 풀어 균액의 농도가 0.5 McFarland가 되도록 맞춘다.
- ③ 보텍스 교반기로 15-20초 정도 아주 강하게 섞어 준다. 만약 큰 덩어리가 남아 있으면 덩어리가 가라 앉은 후 상층액을 사용한다. 잘 풀리지 않는 균종의 경우 멸균된 소형 공이를 사용하여 균 덩어리를 잘게 부수어 준다.
- ④ 냉동 건조된 시약이 들어있는 MIC 플레이트에 접종하는 경우 (2)에서 만들어진 균액 50 μ L를 다음의 희석 용액에 첨가한다. 신속성장형 NTM은 CAMHB 10 mL에, 완속성장형 NTM은 OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase)가 5% 첨가된 CAMHB 10 mL에 각각 첨가한다. 희석한 최종 접종액의 농도는 약 5×10^5 CFU/mL이 된다.
- ⑤ 최종 접종액을 8-10회 정도 위가 아래가 되도록 뒤집어 잘 섞어 준다.
- ⑥ 위가 아래가 되도록 여러 번 뒤집거나 보텍스 교반기로 잘 섞은 최종 접종액을 플라스틱 흡통에 부은 다음 액체배지미량희석법 트레이의 각 well에 100 μ L씩 접종한다.
- ⑦ 접종을 마친 MIC 트레이는 접착성 비닐 덮개로 봉한 후 대기 상태로 배양한다.
- ⑧ 영양한천배지에 최종 접종액을 백금으로 접종하여 접종액의 오염 여부를 점검한다.

2) 자가 제조 패널을 사용할 경우의 접종액 제조

만약 100 μ L씩 항균제 용액이 포함된 MIC 플레이트를 사용할 경우는 다음과 같이 접종액을 준비한다. 이 경우 최종 균 농도가 $1-5 \times 10^5$ CFU/mL (0.1 mL의 각 well에 최종 균 수가 $1-5 \times 10^4$ CFU)이 되도록 36 mL 멸균 증류수에 첨가할 균액의 양을 계산한다. 각 well에 10 μ L씩 접종하는 멀티피펫을 사용하는 경우 접종액을 만드는 방법은 다음과 같다.

- ① 한천배지에 충분히 자란 집락을 멸균된 면봉으로 쓸듯이 문힌다.
- ② 멸균된 유리 구슬 7-10개가 든 4.5 mL 멸균 증류수 튜브에 균을 묻힌 면봉을 풀어 균액의 농도가 0.5 McFarland가 되도록 맞춘다.
- ③ 균액 0.5 mL을 4.5 mL의 멸균 증류수에 첨가한 후 잘 섞어준다(1:10 희석).
- ④ 3에서 만든 균 희석액 4 mL을 36 mL의 멸균 증류수에 첨가한 후 잘 섞어 최종 접종액을 만든다(1:10 희석).
- ⑤ 멀티피펫으로 최종 접종액 10 μ L을 각 well에 첨가한다. 이미 well에는 100 μ L의 항균제 희석액이 들어 있으므로 1:10 희석된다.
- ⑥ 접종을 마친 MIC 트레이는 접착성 비닐 덮개로 봉한 후 대기 상태로 배양한다.
- ⑦ 영양한천배지에 최종 접종액을 백금으로 접종하여 접종액의 오염 여부를 점검한다.

6. NTM 균종별 감수성 검사

1) *M. avium* complex (MAC) 감수성 검사

(1) 감수성 검사의 적응증^{1,5}

[감수성 검사를 반드시 시행해야 하는 경우]

- ① 파종성 MAC 감염 환자에서 치료 후에도 임상 양상이 호전되지 않거나 악화되면서 3개월 이후에도 배양 양성인 경우
- ② 만성 MAC 폐질환 환자에서 치료 후에도 임상 양상이 호전되지 않거나 악화되면서 6개월 이후에도 배양 양성인 경우
- ③ 이전에 macrolide 치료력이 있는 환자에서 분리된 임상적으로 유의한 MAC
- ④ 예방적으로 macrolide 치료를 받고 있는 환자에서 균혈증을 일으킨 MAC
- ⑤ Macrolide 치료 중에 재발한 환자에서 분리된 MAC

[감수성 검사가 권장되는 경우]

: 감수성 검사를 시행하지 않을 경우 나중에라도 필요할 때 감수성 검사를 실시하기 위해 균주를 보관한다.

- ① 혈액이나 조직에서 처음으로 분리된 MAC
- ② 객담, 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage, BAL) 등의 호흡기 검체에서 처음으로 분리된 MAC

(2) 감수성 검사가 필요한 항균제

① 1차 약제

- Clarithromycin: MAC 치료제 중 항균제 감수성 검사와 임상 반응과의 연관성이 입증된 항균제는 clarithromycin과 azithromycin 등의 macrolide가 유일하다. 따라서 macrolide는 MAC 감수성 검사의 1차 약제로 분류된다.⁴ 치료하지 않은 환자에서 분리된 MAC 균주의 clarithromycin MIC는 대개 $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ 이며 azithromycin MIC는 대개 $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ 이다.

② 2차 약제

- Moxifloxacin: macrolide 내성 MAC 분리주 또는 macrolide 치료를 견디지 못하는 환자에서 감수성 검사가 필요하다.
- Linezolid: macrolide 내성 MAC 분리주 또는 macrolide 치료를 견디지 못하는 환자에서 감수성 검사가 필요하다.

③ 기타 약제

- Ethambutol, rifampicin, rifabutin: MIC 결과와 임상 반응과의 연관성은 낮다.
- 대체 약제인 amikacin과 streptomycin 등에 대해서는 연구된 자료가 거의 없다. 위의 5가지 약제들에 대해서는 감수성과 내성을 구별하는 농도(breakpoint)가 설정되어 있지 않다.

(3) 검사방법

- ① 검사법: 액체배지미량희석법 또는 시험관 액체배지희석법(macrodilution)이 추천된다. 액체배지미량희석법의 경우 OADC가 5% 첨가된 CAMHB를 사용한다.⁶ 시험관 액체배지희석법은 12B 배지를 사용한 방사선 동위원소 측정법이 추천된다. Macrolide 검사를 위한 배지의 최적 pH는 논란이 있으나 주로 액체배지미량희석법에서는 pH 7.3-7.4, 방사선 동위원소 측정법에서는 pH 6.8로 검사한다.
- ② 집락의 선택: 투명한 집락이 병독성과 항균제 내성률이 높으므로 가능하면 투명한 집락을 선택한다. 액체배지미량희석법으로 감수성 검사시에는 한천 배지에서 자란 균 집락 또는 액체배지 배양액에서 직접 감수성 검사용 균 접종액을 만들 수 있다.
- ③ 배양 조건: 액체배지미량희석법 트레이는 35-37°C의 대기에서 배양하며 7일 후에 판독한다. 만약 그때까지 배양 대조 well의 균성장이 불충분하면 동일 조건에서 배양하면서 10-14일 사이에 다시 판독한다.

(4) 결과 판독과 보고

- ① 판독 기준은 표 1과 같다.
- ② Macrolide 치료 경험이 없는 환자에서 분리된 MAC 균주가 macrolide 중간내성이나 내성을 나타내는 경우는 거의 없다.
- ③ 이 경우 균주 동정 및 macrolide 감수성 검사를 재검하고 재검한 결과 또한 중간내성일 경우 감수성 균주와 내성 균주의 혼재(mixed population) 가능성을 고려해야 한다.

표 1. MAC 감수성 검사 약제와 판독 기준

항균제	방법(pH)	최소억제농도($\mu\text{g/mL}$)		
		감수성	중간내성 ^a	내성
1차 약제				
Clarithromycin ^b	액체배지미량희석법(pH 7.3–7.4)	≤8	16	≥32
	방사선 동위원소 측정법(pH 6.8) ^c	≤16	32	≥64
2차 약제				
Moxifloxacin	액체배지미량희석법(pH 7.3–7.4)	≤1	2	≥4
Linezolid	액체배지미량희석법(pH 7.3–7.4)	≤8	16	≥32

^a중간내성인 균주는 다음과 같은 주석과 함께 보고한다. “Macrolide 중간내성으로 내성균이 출현하고 있음을 시사한다. 주의 깊게 환자를 추적관찰해야 하며 MAC 균주가 추가로 배양되면 macrolide 감수성 검사를 시행한다.”

^bMAC 분리주의 macrolide 획득내성 기전은 23S rRNA 유전자의 돌연변이로 clarithromycin과 azithromycin에 공통적이다. 비용효율성을 고려하여 한 종류의 macrolide만 검사한다. Azithromycin은 용해성이 낮아 액체배지미량희석법 트레이에 고농도 용액을 만드는 것이 어렵기 때문에 clarithromycin을 macrolide 계열(class) 대표 약제로 선택한다. Azithromycin 감수성은 시험관 액체배지희석법(macrodilution)으로 검사한다.

^cpH 7.3-7.4로 방사선 동위원소 측정을 할 때의 기준은 감수성 $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, 중간내성 8-16 $\mu\text{g/mL}$, 내성 $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ 이다.

(5) 정도관리

- ① 균주: *M. avium* ATCC® 700898 (액체배지미량희석법의 경우 *M. marinum* ATCC® 927을 대신 사용할 수 있음)
- ② Clarithromycin 허용 범위: pH 6.8에서 MIC 허용범위는 1-4 $\mu\text{g/mL}$ 이며, pH 7.3-7.4에서는 0.5-2 $\mu\text{g/mL}$ 이다. *M. marinum* ATCC® 927을 대신 사용할 경우 MIC 허용범위는 0.25-1 $\mu\text{g/mL}$ 이다.
- ③ 2차 약제: 액체배지미량희석법에 대해서만 허용 범위가 제시되어 있다. Moxifloxacin과 linezolid의 경우 MIC 허용 범위는 각각 0.25-2.0 $\mu\text{g/mL}$, 4-16 $\mu\text{g/mL}$ 이다. *M. marinum* ATCC® 927을 대신 사용할 경우 MIC 허용 범위는 모두 1-4 $\mu\text{g/mL}$ 이다. Moxifloxacin 정도관리를 위해서는 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853을 사용할 수도 있으며 MIC 허용범위는 1-8 $\mu\text{g/mL}$ 이다.
- ④ 정도관리 균주의 계대배양: MAC 정도관리 균주는 1주일에 1회 또는 검사 시행 간격이 1주 이상일 경우 검사할 때마다 계대배양한다. 계대배양을 위한 정도관리 균주는 실온에서 보관할 경우 1개월까지 사용할 수 있다.
- ⑤ 1주일에 1회 또는 검사 시행 간격이 1주 이상일 경우 검사할 때마다 정도관리를 시행한다.

2) *M. kansasii* 감수성 검사

(1) 감수성 검사의 적응증

[감수성 검사를 반드시 시행해야 하는 경우]

- ① 치료에 실패하였거나 초기 치료에 반응이 없는 경우 최초 분리된 *M. kansasii*에 대해 감수성 검사를 시행한다.
- ② 적절한 치료에도 불구하고 치료 3개월 이후에도 배양 양성인 경우 새로운 분리주로 감수성 검사를 시행한다.

[감수성 검사가 권장되지 않는 경우]

항균제 치료 전에 분리된 *M. kansasii*의 경우 일반적으로 항균제 감수성 검사가 추천되지 않는다. 감수성 검사를 시행하지 않을 경우 나중에라도 필요할 때 감수성 검사를 실시하기 위해 균주를 보관한다.

(2) 감수성 검사가 필요한 항균제

- ① 1차 약제: clarithromycin과 rifampicin.
※ 치료 실패는 대개 rifampicin 내성과 연관되어 있다.
- ② 2차 약제: amikacin, ciprofloxacin, ethambutol, isoniazid, linezolid, moxifloxacin, rifabutin, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole.
※ Rifampicin MIC >1 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 rifampicin 내성일 경우 검사하도록 한다. Isoniazid, streptomycin은 MIC만 보고한다. Rifabutin은 단백분해효소(protease inhibitor)를 복용하고 있는 HIV 감염 환자에서

rifampicin 대신 치료제로 사용한다.

(3) 감수성 검사 방법

- ① 검사법: OADC가 5% 첨가된 CAMHB를 이용한 액체배지미량희석법.² 시판되는 방사선 동위원소 측정법, 한천 비율법 등도 사용할 수 있다.⁷
- ② 배양 조건: 35-37°C의 대기 또는 5-10% CO₂에서 7-14일간 배양한다. Macrolide 감수성 검사는 대기 상태에서 배양한다.

(4) 결과 판독과 보고

판독 기준은 표 2와 같다.

표 2. *M. kansasii* 감수성 검사 약제와 내성을 나타내는 최소억제농도

항균제	내성을 나타내는 최소억제농도(μ g/mL)
1차 약제	
Clarithromycin ^a	> 16
Rifampicin ^b	> 1
2차 약제	
Amikacin	> 32
Ciprofloxacin	> 2
Ethambutol	> 4
Isoniazid	— ^d
Linezolid	> 16
Moxifloxacin	> 2
Rifabutin	> 2
Streptomycin	— ^d
Trimethoprim-sulfamethoxazole	> 2/38

^aClarithromycin, rifampicin, ethambutol 3제 단기 요법 치료 시 clarithromycin은 1차 약제로 분류된다. 그러나 rifampicin, ethambutol, isoniazid, clarithromycin으로 구성된 전통적 4제 요법 시 clarithromycin은 2차 약제로 분류된다. Clarithromycin은 azithromycin, roxithromycin 등의 새로운 macrolide 계열의 대표 약제이다.

^b단백분해효소 억제제를 복용하고 있는 HIV 감염 환자에서 rifampicin 감수성인 균주는 모두 rifabutin 감수성이라고 가정할 수 있다.

^cCiprofloxacin과 levofloxacin은 서로 교체 가능하지만, moxifloxacin에 비해 생체 외 활성이 떨어진다.

^dIsoniazid와 streptomycin은 임상적으로는 유용하지만 NTM에 대한 감수성 및 내성 판독 기준이 아직까지 설정되어 있지 않다. 이 두 약제에 대해서는 판독 없이 MIC만 보고한다.

(4) 정도관리

- ① 정도관리 균주: *M. kansasii* ATCC[®] 12478, *M. marinum* ATCC[®] 927, *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212
- ② Rifampicin의 허용 범위: *M. kansasii* ATCC[®] 12478는 $\leq 1 \mu$ g/mL, *M. marinum* ATCC[®] 927은 ≤ 0.25 -1.0

$\mu\text{g/mL}$, *E. faecalis* ATCC® 29212은 0.5-4.0 $\mu\text{g/mL}$ 이다.

③ 1주일에 1회 또는 검사 시행 간격이 1주 이상일 경우 검사할 때마다 정도관리를 시행한다.

3) *M. marinum* 감수성 검사

(1) 감수성 검사의 적응증

M. marinum 질환은 대개 국소적인 경우가 많고 병변에 존재하는 균의 수가 적어 단독 항균제 요법이 많이 사용된다. 단독 항균제 요법에 사용되는 rifampicin, doxycycline, minocycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, clarithromycin 등에 대해서 *M. marinum*의 MIC는 감수성 범위 내에 분포하고, 치료 시에 생길 수 있는 획득 내성의 가능성 또한 유의한 수준이 아니기 때문에 일상적인 감수성 검사는 추천되지 않는다.

[감수성 검사를 반드시 시행해야 하는 경우]

:수 개월 동안의 치료에도 불구하고 배양 양성인 치료 실패 환자에서 분리된 균주에 대해서 시행한다.

(2) 감수성 검사가 필요한 항균제

표 3과 같다.

표 3. *M. marinum* 감수성 검사 약제와 판독 기준

항균제	내성을 나타내는 최소억제농도($\mu\text{g/mL}$)
Amikacin	> 32
Ciprofloxacin	> 2
Clarithromycin ^a	> 16
Doxycycline/minocycline	> 4
Ethambutol	> 4
Moxifloxacin	> 2
Rifabutin	> 2
Rifampin	> 1
Trimethoprim-sulfamethoxazole	> 2/38

^aClarithromycin은 azithromycin, roxithromycin 등의 새로운 macrolide 계열 대표 약제이다.

(3) 검사방법

- ① 검사 원리: OADC가 5% 첨가된 CAMHB를 이용한 액체배지미량희석법⁷
- ② 배양 조건: 28-30°C의 대기 또는 5-10% CO₂에서 7일간 배양한다. Macrolide 감수성 검사는 대기 상태에서 배양한다.

(4) 결과 판독과 보고

판독 기준은 표 3에 나타내었다.

4) 배양 조건이 까다롭지 않은 완속성장형 NTM 감수성 검사

(1) 해당 균종: *M. terrae/nonchromogenicum*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. simiae* 등

(2) 감수성 검사가 필요한 항균제: *M. kansasii*와 동일(표 2)

(3) 검사방법

- ① 검사 원리: OADC가 5% 첨가된 CAMHB를 이용한 액체배지희석법
- ② 배양 조건: 35-37°C의 대기 또는 5-10% CO₂에서 7-14일간 배양한다. Macrolide 감수성성 검사는 대기 상태에서 배양한다. *M. xenopi*의 경우 CAMHB 배지에서 잘 자라지 않지만 최적의 배지가 아직 알려져 있지 않고 일부 균주는 42-45°C에서 더 잘 자란다.

(4) 결과 판독과 보고

*M. kansasii*와 동일. (표 2).

5) 배양 조건이 까다로운 완속성장형 NTM 감수성 검사

(1) 해당 NTM 균종

- ① *M. haemophilum*: 성장을 위해 ferric ammonium citrate 또는 hemin이 필요
- ② *M. genavense*: 방사선 동위원소 측정법으로 6주 이상 배양
- ③ *M. ulcerans*: 30°C에서 4-6주간 배양

(2) 감수성 검사가 필요한 항균제: 아직까지 표준화되지 않았음

(3) 검사방법

- ① 아직까지 표준화되지 않았기 때문에 검사실 자체의 검증이 필요함
- ② *M. haemophilum* 감수성 검사를 위한 한천 디스크 용출법은 부록 1 참고

6) 신속성장형 NTM의 항균제 감수성 검사

(1) 감수성 검사의 적응증

[감수성 검사를 반드시 시행해야 하는 경우]

- ① 혈액, 조직, 피부 및 연부 조직에서 분리된 신속성장형 NTM
- ② ATS의 NTM 폐질환 진단 기준에 부합되는 호흡기 분리 신속성장형 NTM
- ③ 호흡기 분리주를 제외하고 적절한 치료에도 불구하고 6개월 이후에도 동일한 신속성장형 NTM이 배양된 경우 감수성 검사를 실시한다.

(2) 감수성 검사가 필요한 항균제

표 4와 같다.

표 4. 신속성장형 NTM의 감수성 판독 기준

항균제	최소억제농도($\mu\text{g/mL}$)		
	감수성	중간내성	내성
Amikacin ^a	≤ 16	32	≥ 64
Cefoxitin	≤ 16	32–64	≥ 128
Ciprofloxacin ^b	≤ 1	2	≥ 4
Clarithromycin ^c	≤ 2	4	≥ 8
Doxycycline ^d	≤ 1	2–4	≥ 8
Imipenem ^e	≤ 4	8–16	≥ 32
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
Meropenem	≤ 4	8–16	≥ 32
Moxifloxacin	≤ 1	2	≥ 4
Trimethoprim–sulfamethoxazole	$\leq 2/38$	–	$\geq 4/76$
Tobramycin ^g	≤ 2	4	≥ 8

^aMIC $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ 인 *M. abscessus* 분리주는 재검하여야 한다. 재검한 결과가 $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ 인 경우 다음과 같은 주석과 함께 보고한다. 1) Amikacin MIC는 일반적으로 관찰되는 *M. abscessus* MIC보다 높음. 2) Amikacin을 치료제로 고려한다면 검사실로 연락 바람. 결핵연구원에 확인 검사를 요청할 예정임.

^bCiprofloxacin과 levofloxacin은 서로 교체 가능하지만, 8-methoxy fluoroquinolone에 비해 생체 외 활성이 떨어진다.

^c신속성장형 NTM에 의한 폐질환 치료에 Clarithromycin 단독 요법은 추천되지 않는다. Clarithromycin은 azithromycin, roxithromycin 등의 새로운 macrolide의 계열 대표 약제이다.

^dMinocycline으로 대체 가능하다.

^e감수성과 내성을 나누는 기준은 잠정적임. 만약 *M. fortuitum* group, *M. smegmatis* group, *M. mucogenicum*의 MIC가 $>8 \mu\text{g/mL}$ 일 경우 재검하도록 하며 이 때 배양 기간은 3일을 넘지 않도록 한다. 재검한 결과가 MIC $>8 \mu\text{g/mL}$ 일 경우 다음과 같은 주석과 함께 보고한다. 1) Imipenem MIC는 일반적으로 이 균주에서 관찰되는 MIC보다 높음. 2) Imipenem을 치료제로 고려한다면 검사실로 연락 바람. 결핵연구원에 확인 검사를 요청할 예정임. Imipenem 결과로 meropenem 또는 ertapenem 결과를 예측할 수 없다. 신속성장형 NTM에 대한 활성은 imipenem이 meropenem이나 ertapenem보다 높다.

^fMIC는 대조 웰과 비교하여 균 성장이 80% 이상 억제되는 농도로 결정한다.

^gTobramycin은 *M. chelonae* 감염 치료에 주로 이용된다. 만약 *M. chelonae* 분리주의 MIC가 $>4 \mu\text{g/mL}$ 일 경우 tobramycin 감수성 검사를 재검한다. 재검한 결과가 MIC $>4 \mu\text{g/mL}$ 일 경우 다음과 같은 주석과 함께 MIC값을 보고한다. 1) Tobramycin MIC는 일반적으로 관찰되는 *M. chelonae* MIC보다 높음. 2) Tobramycin을 치료제로 고려한다면 검사실로 연락 바람. 결핵연구원에 확인 검사를 요청할 예정임. Tobramycin은 *M. abscessus* 또는 *M. fortuitum* group의 치료제로 추천되지 않는다. *M. abscessus*에 의한 폐질환 치료를 위한 tobramycin 흡인 제제의 효용성에 대해서는 아직까지 연구 자료가 없다.

(3) 검사방법

- ① 검사 원리: CAMHB를 이용한 액체배지미량희석법^{1,8}
- ② 집락의 선택: 한천 배지에 계대배양한 집락. 치료 중인 환자에서 분리된 일부 균주는 MIC 판독을 위한 충분한 균 성장을 얻기 위해 2회 이상 계대배양해야 되는 경우도 있다.
- ③ 배양 조건: 28–30°C에서 72시간 배양

(4) 결과 판독과 보고

- ① 배양 후 72시간에 판독한다. 균이 성장하면 배지가 혼탁해지거나 바닥에 균 침전이 생긴다. 성장 대조 웰에 균 성장 척도 2+ 이상 균이 성장하면 판독한다. 균 성장 척도는 그림 1에 나타내었다.
- ② 만약 3일째 균 성장이 충분하지 않으면 4일째, 4일째에도 충분하지 않으면 5일째 다시 판독한다.
- ③ 만약 5일째에도 균 성장이 충분하지 않으면 감수성 검사를 처음부터 다시 실시한다. Clarithromycin을 제외하고는 5일 이내에 판독한다. 유도성 macrolide 내성을 검출하기 위해 색소 비생성 신속성장형 NTM의 macrolide MIC는 14일째에 최종적으로 판독한다. 그 이전에 macrolide MIC가 내성을 나타내면 바로 보고한다. 판독 기준은 표 4에 나타내었다.
- ④ 특정 신속성장형 NTM은 특정 항균제에 대부분 감수성이다. 예를 들어 *M. abscessus*는 amikacin에, *M. fortuitum* group, *M. smegmatis* group, *M. mucogenicum*은 imipenem에, *M. chelonae*는 tobramycin에 감수성이므로, 판독 결과 해당 균-항균제 조합이 내성일 경우 균 동정과 감수성 검사를 재검한다.

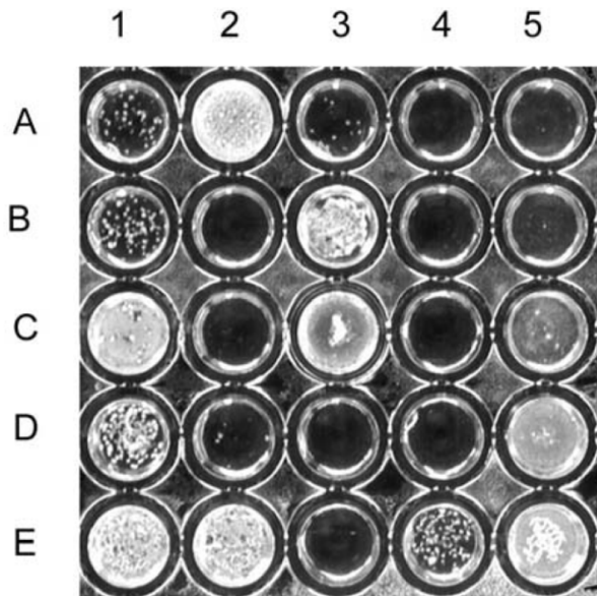


그림 1. 신속성장형 NTM 감수성 검사 판독을 위한 균 성장 척도. “±”는 1–5개의 집락 또는 균 조각(flake)이 있으면서 연하지만 확실한 혼탁이 있을 때 사용한다. 최종 접종액을 만들 때 균 집락이 잘 풀리지 않고 접종된 작은 균 덩어리는 음성으로 판독해야 한다.

1E: 대조 성장(4+), 3A: ± 몇 개의 셀 수 있는 집락; 혼탁은 없음(5B와 2D도 ±), 5C: ± 몇 개의 셀 수 있는 집락; 흐릿한 혼탁(3E도 ±), 5D: 1+ 분명한 흐림 또는 혼탁, 5E: 2+ 분명한 혼탁과 함께 “덩어리져서 자람”, 1B: 2+ 중간(moderate) 정도의 셀 수 있는 집락; 약간 혼탁함, 1D: 3+ 대량의 집락이 보이는 성장, 4E: 3+ 대량의 균 성장; 혼탁, 1C: 4+ 대조 성장과 비슷한 수준의 융합성 균 성장(2A와 2E도 4+), 4A, 5A, 2B, 4B, 4C, 3D, 4D 웰은 모두 음성으로 판독한다.

(5) 정도관리

- ① 정도관리 균주: *M. peregrinum* ATCC® 700686, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213, *P. aeruginosa* ATCC® 27853, *E. faecalis* ATCC® 29212가 대신 사용될 수 있다.
- ② 정도관리 균주의 MIC 허용 범위. $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 3일간 배양했을 때 MIC 허용범위는 표 5에 나타내었다.

표 5. 신속성장형 NTM 감수성 검사에서 정도관리 균주의 최소억제농도 허용 범위

항균제	최소억제농도($\mu\text{g/mL}$)의 허용 범위			
	<i>M. peregrinum</i> ATCC® 700686	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212
Amikacin	$\leq 1-4$	1-4	1-4	64-256
Cefoxitin	4-32	1-4	— ^a	— ^a
Ciprofloxacin	$\leq 0.12-0.5$	0.12-0.5	0.25-1	0.25-2
Clarithromycin	$\leq 0.06-0.5$	0.12-0.5	— ^a	— ^a
Doxycycline	0.12-0.5	0.12-0.5	— ^a	2-8
Imipenem	2-16	0.015-0.06	1-4	0.5-2
Linezolid	1-8	1-4	— ^a	1-4
Meropenem ^b	2-16	0.03-0.12	0.25-1	2-8
Minocycline	0.12-0.5	0.06-0.5	— ^a	1-4
Moxifloxacin	$\leq 0.06-0.25$	0.015-0.12	1-8	0.06-0.5
Tobramycin	2-8	0.12-1	0.25-1	8-32
SXT ^c	$\leq 0.25/4.8-2/38$	$\leq 0.5/9.5$	8/152-32/608	$\leq 0.5/9.5$

^a현재 추천되는 방법에 대한 연구가 전혀 없음

^b예비 연구에서 *M. fortuitum* group, *M. mucogenicum*, 일부 색소침착 신속성장형 NTM에서 meropenem은 생체 외 활성을 보인다.

^cTrimethoprim-sulfamethoxazole. MIC는 균 성장이 대조 웰과 비교하여 80% 이상 억제되는 농도로 결정한다.

7. 정도관리

2011년 1차 결핵진료지침에서 기술한 결핵균 감수성 검사의 정도관리 방법과 유사하다. 여기서는 전체적인 NTM 감수성 검사의 정도관리 방법에 대해 기술하겠다.

1) 정도관리 균주의 정도관리

- (1) 보관 조건: 15% glycerol이 첨가된 tryptic soy broth 또는 skim milk broth에 정도관리 균을 소분(aliquot)하여 -20°C 이하, 이상적으로 -60°C 이하로 보관한다. 냉동고는 성애 제거 기능이 없는 것을 사용한다.

(2) 정도관리 균주의 계대배양

- 정도관리 균주는 검사 전 단독 집락을 얻기 위해 적절한 한천 배지에 계대배양한다.
- 정도관리 균주는 1주일에 1회 또는 검사 시행 간격이 1주 이상일 경우 검사할 때마다 계대배양한다. 계대배양을 위한 정도관리 균주는 실온에 보관할 경우 1개월까지 사용할 수 있다.
- 정도관리에서 허용된 범위를 벗어난 결과가 나왔을 경우 정도관리 균주가 가지고 있는 고유의(inherent) 감수성 양상이 변화되었음을 시사한다. 이 경우 새로운 동결 보관 정도관리 균주를 배양하여 정도관리 과정을 다시 실시한다.

2) 시약의 정도관리

- (1) 모든 배지 또는 배지 성분의 로트(lot) 번호는 기록해 둔다.
- (2) 새 로트의 약제, 배지 및 배지 성분이 입고되면 정도관리 균주를 이용하여 검사한다. 상품화된 액체배지 미량희석법 트레이를 사용할 경우, 새로운 로트의 트레이가 입고되면 사용하기 전에 적절한 정도관리 균주로 검사한다.
- (3) 무균성 검사: 액체배지미량희석법 배치(batch) 또는 로트마다 접종하지 않은 트레이 1개를 하룻밤 배양하여 배지의 무균성을 검증한다.
- (4) 세균 성장능 검증: 액체배지미량희석법 트레이에는 항균제가 들어 있지 않은 성장 대조 웰이 포함되어 있어야 한다.
- (5) 정도관리 균주의 결과가 허용 범위를 벗어날 경우 해당 로트의 시약 또는 액체배지미량희석법 트레이는 사용할 수 없다. 정도관리 균주의 결과가 허용 범위를 벗어난 경우 환자 결과를 보고해서는 안 된다.

3) 최종 접종액의 순수 배양 검사

- (1) 일반 세균 오염 검사: 최종 접종액이 일반 세균에 의해 오염될 수 있다. 액체배지미량희석법을 실시한 후 남은 접종액을 초콜릿 배지 또는 trypticase soy 한천에 접종한 후 하룻밤 배양하여 일반 세균의 오염 여부를 관찰한다.
- (2) 다른 항산균의 오염 여부: 최종 접종액을 Middlebrook 7H10 또는 7H11 한천 배지에 접종한다. *M. haemophilum*의 경우는 초콜릿 배지에 접종한다. 검사한 NTM의 집락을 관찰하는데 필요한 기간 동안 배양하여 다른 항산균의 오염 여부를 관찰한다.

4) 판독의 정도관리

- (1) 목적: 서로 다른 검사자 간의 최종점(end-point) 판독 변이를 최소화하기 위해 필요하다.
- (2) 빈도: 연 2회
- (3) 정도관리 균주: *M. peregrinum* ATCC® 700686 및 *M. avium* ATCC® 700898
- (4) 방법: NTM 감수성 검사를 시행하는 모든 검사자는 각기 독립적으로 감수성 검사의 최종점을 판독하고 기록한다. 가장 경험이 많은 검사자의 판독 결과와 비교하여 1 회석배수 이내여야 한다. 만약 이 범위를 벗어나면 해당 검사자를 재교육한다.

5) 외부 정도관리

- NTM 감수성 검사를 직접 실시하는 경우 정기적으로 검사 수행도(performance)를 평가해야 한다.
- College of American Pathologists (CAP): 시범 사업으로 NTM 감수성 검사에 대한 정도관리 검체를 제공하고 있다. 국내 대한임상검사정도관리협회에서는 아직까지 NTM 감수성 검사에 대한 외부정도관리를 시행하고 있지 않다.
- CAP 외부정도관리에 참여하지 않는 검사실의 경우 연 2회 검사실간 비교를 시행한다. 이 경우 완속성장형 NTM 및 신속성장형 NTM을 모두 포함하여 시행하도록 한다.

8. 참고 문헌

- 1) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:367-416.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard □ 2nd Ed. CLSI Document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 3) http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/resource-centre/find_documentation/pdfs/mgit_manual_nov_2007.pdf
- 4) Ferris NP, Nordengrahn A, Hutchings GH, et al. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. J Virol Methods 2009;155:10-7.
- 5) Inderlied CB. Microbiology and minimum inhibitory testing for Mycobacterium avium complex prophylaxis. Am J Med 1997;102(5C):2-10.
- 6) Brown BA, Wallace RJ Jr, Onyi GO. Activities of clarithromycin against eight slowly growing

species of nontuberculous mycobacteria, determined by using a broth microdilution MIC system. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1987-90.

- 7) Steadham JE, Stall SK, Simmank JL. Use of the BACTEC system for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis, M. kansasii, and M. avium complex. Diagn Microbiol Infect Dis 1985;3:33-40.
- 8) Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, et al. Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae, and Mycobacterium fortuitum. J Clin Microbiol 1999;37:1676-82.

표 4. *M. haemophilum*의 한천 디스크 용출법

항균제	농도(μ g)	5 mL 배지에 넣는 디스크 수	Well의 최종 항균제 농도(μ g/mL)
Amikacin	30	2	12
Ciprofloxacin	5	2	2
Clarithromycin	15	5	15
Doxycycline	30	1	6
Linezolid	30	1	6
Minocycline	30	1	6
Rifampicin	5	1	1
SXT	23.75-1.25	2	0.5

약어: SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole

부록 1.

한천 디스크 용출법을 이용한 *M. haemophilum* 감수성 검사

1. 검사방법

결핵균 감수성 검사를 위한 내성균의 비율법(agar proportion method)과 유사하다.

- 1) 원형의 6웰(6-well) 배양 플레이트를 사용한다. 각각의 웰에 0.5 mL의 OADC를 첨가한다.
- 2) 아래 표 4에 있는 적절한 항균제 디스크를 놓는다. 웰의 바닥에 조심스럽게 놓은 후 OADC 용액이 디스크에 스며들게 한다. 각 웰에 hemin 디스크 한 장을 놓는다. 한 웰은 hemin 디스크는 놓고 항균제 디스크를 놓지 않은 성장 대조 웰로 둔다.
- 3) 실온에 15분간 방치하여 배지 내로 디스크의 약제가 용출되도록 한다.
- 4) 고압 증기 멸균한 후 충분히 식힌 Middlebrook 7H10 한천 4.5 mL을 각각의 웰에 조심해서 소용돌이 모양으로 넣어준다. 이 때 멸균된 나무 막대로 저어 주면서 디스크는 중앙에 위치하도록 한다. 나무 막대는 각 웰에 하나씩 따로 사용한다.
- 5) 액체 한천이 고형화되도록 30-60분 정도 laminar flow가 흐르는 생물학적 안전 상자 안에 둔다. 뚜껑이 약간 열린 상태로 두어 수증기가 증발할 수 있도록 한다. 이렇게 준비된 감수성 시험용 플레이트는 즉시 사용하거나 밀봉된 비닐 봉지에 넣어 보관하면서 1주일 내에 사용한다. 모든 플레이트는 보관 시 빛이 들어가지 않게 한다.
- 6) 한 번에 만든 감수성 플레이트 중 하나는 무균성 검사를 시행한다. 35°C에서 48시간 동안 배양하면서 오염된 세균이 성장하는지 관찰하고 폐기한다.
- 7) 면봉으로 쓸듯이 균을 취하여 액체배지 또는 멸균된 증류수에 풀어 0.5 McFarland 혼탁도에 맞춘다. 이것을 다시 액체배지 또는 멸균된 증류수에 1:100 희석하여 각 웰당 100 μ L씩 접종한다.
- 8) 28-30°C에서 14-21일동안 배양한다.
- 9) 결과 판독: 균 성장이 없는 웰은 감수성으로 판독한다. Trimethoprim-sulfamethoxazole은 균 성장이 80% 이상 억제되면 감수성으로 판독한다. 항균제가 든 웰에 집락이 하나라도 생기면 내성으로 판독한다.

2. 참고문헌

- 1) McBride ME, Rudolph AH, Tschien JA, et al. Diagnostic and therapeutic considerations for cutaneous Mycobacterium haemophilum infections. Arch Dermatol 1991;127:276-7.
- 2) Vadney FS, Hawkins JE. Evaluation of a simple method for growing Mycobacterium haemophilum. J Clin Microbiol 1985;22:884-5.