

용역연구 최종보고서

## 제목: TB-LAMP 유용성 평가

연구기관: 결핵연구원

주연구자: 김창기

## 1. 연구배경 및 목적

결핵은 호흡기로 전파되는 전염병으로 인류역사와 함께 해온 질환이다. 지금까지 많은 결핵환자가 발생하였고 많은 수가 사망하였다. 세계보건기구(WHO)를 비롯한 국제기구와 각국 보건당국의 노력으로 인해 결핵발생률과 사망률이 지속적으로 낮아지고 있으나 2012 WHO 보고에 따르면 전세계적으로 2011년 8백7십만명의 결핵환자가 발생하였고 백사십만명이 결핵으로 사망하였다. 22개 결핵고부담 국가에서 전세계의 80% 정도의 결핵이 발생하고 있으며 내성결핵의 증가와 HIV/TB 공동감염은 결핵퇴치의 가장 큰 걸림돌이 되고 있다.

국내 결핵은 한국전쟁 이후 급격히 증가하여 1965년 결핵실태조사에서 전인구의 5%가 X-ray상에서 결핵이 의심될 정도로 심각하였다. 그러나 경제성장과 효과적인 결핵관리로 인해 유병률은 급격히 감소하였고 이는 결핵관리의 모범사례가 되고 있다. 2000년 결핵환자 신고시스템을 도입한 이후 결핵발생률을 결핵지표로 추적하고 있다. 최근 결핵에 대한 관심부족과 정책의지의 약화로 과거에 비해 결핵관리 지표가 정체되어 있는 실정이다. 2011년 결핵신고환자 수가 50,000명이 넘었으며 OECD 회원국 중에서 결핵발생률과 사망률이 가장 높다.

결핵진단을 위해서 여러 검사법이 이용되고 있으나 확진과 치료반응 확인을 위해서 미생물검사가 반드시 필요하다. 전통적으로 도말과 배양검사가 이용되고 있으며 감수성검사도 배양법에 그 기초를 두고 있다. 그러나 통상미생물검사에는 많은 한계점이 있다. 도말검사는 쉽고 간편하게 전염력이 높은 결핵환자를 검출할 수 있는 장점이 있지만 민감도가 낮고 사균과 NTM을 검출할 수 있는 문제가 있다. 결핵의 느린 증식으로 인해 배양검사에 오랜 시간이 소요된다. 고체배지를 사용할 경우 8주간 배양해야 하며 액체배지를 이용할 경우 6주간 배양해야 한다. 감수성검사의 경우도 배양하여 검사하기 때문에 최소 4주 정도의 시간이 소요된다. 또한 배양된 균을 다룰 경우 결핵감염 위험이 매우 높으며 감수성검사의 숙련도 유지가 어려워 특수한 시설과 경험이 있는 상위검사실에서만 시행할 수 있다. 따라서 기존 검사법을 보완할 수 있는 검사의 요구가 커졌으며 분자생물학적 기법이 결핵검사에 많이 활용되고 있다. 검체에서 결핵균의 유전자를 검출하는 핵산증폭검사는 도말검사에 비해 민감도와 특이도가 우수하고 배양법에 비해 결과보고가 빠른 장점이 있다. 빠른 환자발견은 추가적인 결핵확산을 방지하는데 큰 기여를 하고 있으며 조기 진단으로 환자 치료 성공률도 높아지게 된다. 따라서 많은 국가에서 핵산증폭검

사를 결핵관리에 적극적으로 활용하고 있으며 우리나라도 결핵진료지침에서 모든 결핵의 심자에 대해서 시행할 것을 권고하고 있다. 국내에서는 이미 핵산증폭검사가 활발히 이용되고 있는데 많은 수의 기관이 real-time PCR을 사용하고 있다. Real-time PCR은 민감도가 높고 기존 PCR에 비해 결과판정이 객관적이고 교차오염의 위험이 낮다. 그러나 real-time PCR을 현장에서 이용하는데 여러 어려움이 있다. 우선 검사시간이 2시간 정도이고 안정적인 전기공급이 필요하다. 또한 DNA 추출 등의 수기검사과정이 있다. 따라서 대부분의 검사실은 적정수의 검체가 모여야 real-time PCR을 시행하고 있고 현장검사로 활용되기는 아직 어렵다. 따라서 검사과정이 좀 더 단순하고 현장에서도 시행하기 쉬운 핵산증폭검사의 필요성이 대두되었다.

일본 Eiken사에서 개발한 TB-LAMP는 등온증폭검사로서 결핵균의 DNA를 검출할 수 있다. 검사시간은 1시간이며 real-time PCR에 비해 단순한 장비를 이용하고 있다. 그리고 DNA 추출 kit가 시약에 포함되어 있어 별도 시설이 없어도 검사가 가능하다. 따라서 검사실 인프라가 열악한 상황이나 이동검진같이 신속하게 결과확인 필요한 상황에서 유용할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 TB-LAMP의 검사 정확성과 유용성을 기존 결핵검사 및 real-time PCR과 평가하고자 한다.

## **2. 연구재료 및 방법**

### **1) 검체**

결핵연구원으로 real-time PCR 검사 의뢰된 객담검체를 이용하였다. 2015년 5월부터 9월까지 총 290개 검체를 수집하였고 모든 검체에 대해서 도말검사, 배양검사, real-time PCR 그리고 TB-LAMP를 시행하였다.

### **2) 검체 전처리 및 미생물검사**

전처리되지 않은 객담으로 도말을 제작하고 형광법으로 염색을 하였으며 결과 판정은 WHO 기준에 따랐다. 총 290개 검체 중에서 도말검사 양성은 104건(35.9%)이었다.

두 가지 종류의 배양법을 이용하였으며 일부 검체에 대해서는 고체와 액체배지에 모두 접종하였으나 나머지 검체에 대해서는 고체배양만을 실시하였다. 고체배양만 시행된 검체에 대해서는 simple culture method를 이용하여 2% Ogawa 배지에 접종하였고 액체배양과 고체배양을 함께 시행한 검체에 대해서는 Lowenstein-Jensen (LJ)배지와 MGIT 960 system을 이용하여 배양을 시행하였다. 총 290 검체 중 결핵배양 양성은 67건이었고, 33 검체에서 NTM이 증식하였다. 188건은 배양음성이었으며 2건에서 재오염처리 후에도 오염이 발생하였다.

### **3) Real-time PCR**

결핵연구원에서 사용하는 LG Advansure TB/NTM real-time PCR을 이용하였다. 전처리가 끝난 검체에서 bead beating method를 이용하여 DNA를 추출하였고 제조사의 지침에 따라 검사를 시행하였다.

### **4) TB-LAMP**

전처리 후 남은 잔여검체에서 Loopamp™ Pure DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 추출하였고, DNA 주형은 Loopamp™ MTBC detection kit에 loading하였다. 제조사의 지침대로 tube를 잘 흔들어 시약이 잘 섞이도록 한 후 LA-500 장비에 장착하여 40분간 반응을 시킨 후 혼탁도를 측정하여 결과를 판정하였다.

### 3. 결과

#### 1) 도말 결과에 따른 TB-LAMP 결과분석

타검사 결과에 상관없이 분석하였을 경우 도말음성 검체에서 TB-LAMP 양성률이 7.5%, scanty에서는 17.6%이었으나 1+ 검체에서는 73.6%가 양성으로 차이가 있었다(표 1). 도말검사 2+ 이상인 경우 양성률은 81.3-88.9%로 높았다.

표 1. 도말 grade에 따른 TB-LAMP 결과 비교

Smear	TB-LAMP		Total
	Positive (%)	Negative (%)	
Negative	14 (7.5)	172 (92.5)	186
Scanty	3 (17.6)	14 (82.4)	17
1+	39 (73.6)	14 (26.4)	53
2+	13 (81.3)	3 (18.8)	16
3+	16 (88.9)	2 (11.1)	18
Total	85 (29.3)	205 (70.7)	290

#### 2) 배양결과에 따른 TB-LAMP 결과분석

총 290건에 대해서 배양검사를 실시하였다. 이중 134건은 고체와 액체배지 모두 배양되었고 나머지 156건은 고체배양만 시행되었다. 결핵균 배양양성은 67건이었고 이 중에서 56건이 TB-LAMP 양성으로 민감도는 83.6%이었다. 결핵배양 양성 중 도말이 양성이었던 검체는 50건이었고 도말음성 검체는 17건이었는데 TB-LAMP는 각각 46건, 10건에서 양성이었다. 따라서 도말양성/배양양성 검체에서 민감도는 92.0%, 도말음성/배양양성 검체에서 민감도는 58.8%이었다. 배양검사에서 균증식 없었던 검체가 총 188건이었으며 이 중 14.9%(28건)가 TB-LAMP 양성이었다. 배양음성 중 TB-LAMP에 양성인 검체 모두 real-time PCR에서도 양성이었다. 따라서 TB-LAMP가 위양성 결과를 보인 것이 아니라

치료 중인 환자 검체이거나 운송과정 중 결핵균이 사멸한 것으로 판단된다. NTM 배양 양성인 검체에서 TB-LAMP 양성이 없었다.

표 2. 항산균 배양검사와 TB-LAMP 결과비교

Culture	TB-LAMP		Total
	Positive (%)	Negative (%)	
MTB	56 (83.6)	11 (16.4)	67
NTM	0 (0)	33 (100)	33
No growth	28 (14.9)	160 (85.1)	188
Contam	1 (50.0)	1 (50.0)	2
Total	85 (29.3)	205 (70.7)	290

MTB, *M. tuberculosis*; NTM, nontuberculous mycobacterial; Contam, contamination

### 3) Real-time PCR과 TB-LAMP 결과비교

LG Advansure real-time PCR 결과와 TB-LAMP 결과를 상호 비교하였다. LG 키트에서 결핵균이 검출된 경우는 총 103건(MTB/NTM mix 포함)인데 TB-LAMP 양성은 이 중에서 85건으로 82.5%이었다. 그 외 NTM 양성 및 음성 결과를 보인 검체에서는 TB-LAMP 양성이 없었다.

표 3. Real-time PCR 결과와 TB-LAMP 결과비교

LG Advansure	TB-LAMP		Total
	Positive (%)	Negative (%)	
MTB	85 (84.2)	16 (15.8)	101
MTB/NTM mix	-	2 (100)	2
NTM	-	33 (100)	33
negative	-	154 (100)	154
Total	85 (29.3)	205 (70.7)	290

MTB, M. tuberculosis; NTM, nontuberculous mycobacterial

LG real-time PCR 키트 양성인 검체에 대해서 세부적인 결과를 분석하였는데 ct 값이 30미만인 양성검체 79건 중에서 TB-LAMP 양성이 78건으로 98.7%이었다. 그러나 cv 값이 30이상인 양성 검체에서는 양성률이 29.2%로 낮았다.

표 4. Real-time PCR cv value에 따른 TB-LAMP 결과 분석

ct value	TB-LAMP		Total
	Positive (%)	Negative (%)	
<30	78 (98.7)	1 (1.3)	79
≥30	7 (29.2)	17 (70.8)	24
Total	85 (82.5)	18 (17.5)	103

#### 4. 요약

TB-LAMP는 간단한 검사과정을 통해 신속하게 시행할 수 있는 핵산증폭검사다. 실제 검사시간이 1시간에 불과하고 검사에 관련된 추가 재료나 시약 없이 검사를 시행할 수 있는 점도 장점 중 하나이다. 본 연구에서는 미생물 검사인 도말과 배양검사 그리고 기존 핵산증폭검사와 비교를 통해 TB-LAMP의 성능과 유용성을 평가하였다.

도말 grade에 따라 분석할 경우 도말 grade가 높아지면서 양성률도 상승하는 것을 볼 수 있었다. 도말 2+ 이상이면 TB-LAMP 양성률이 80%를 넘는 것을 알 수 있었다. 배양검사와 비교 시 전반적인 민감도는 83.6%이었다. 이를 도말결과에 따라 분석하면 도말양성/배양양성 검체에서 민감도가 92.0%이고 도말음성/배양양성 검체 민감도가 58.8%이었다. 이는 기존 연구와 다소 차이가 있었다. Mitarai 등은 direct 검체를 이용하였을 때 도말양성/배양양성 검체의 민감도를 98.2%, 집균하여 시행하였을 때 98.9%로 보고하였는데 본 연구에서는 민감도가 92.0%로 다소 낮았다. 반면 도말음성/배양양성의 경우 Mitarai의 연구에서는 direct 방법이 55.6%, 집균 방법이 30.2%로 본 연구보다 낮았다. 중국에서 시행한 대규모 평가연구에서의 도말양성/배양양성 검체에 대한 TB-LAMP의 민감도는 92.12%이었고 도말음성/배양양성 검체는 53.81%로 본 연구와 비슷한 값을 보였다. 도말양성이면서 배양양성인 검체 50건 중에서 4건이 TB-LAMP 음성이었는데 모두 도말결과가 scanty로 균량이 적은 검체였다. 배양음성 검체에서 TB-LAMP 양성이 28건 있었으나 LG real-time PCR도 모두 양성이었다. 따라서 본 결과는 위양성이 아닌 것으로 판단되며 치료 중인 환자 검체일 가능성이 있다고 판단하였다.

본 연구에서는 도말검사와 배양검사 외에 real-time PCR과도 결과를 비교하였다. 총 103건이 real-time PCR 결핵양성이었고 이 중 85건(82.5%)이 TB-LAMP 양성이었다. Real-time PCR 음성과 NTM 양성인 검체에서는 모두 TB-LAMP가 음성이었다. Real-time PCR ct 값에 따라 TB-LAMP 양성률에도 차이가 있었는데 30보다 낮은 ct 값을 보인 경우 대부분 TB-LAMP도 양성이었으나 ct 값이 그 보다 높을 경우 양성률은 29.2%로 크게 낮았다. 따라서 TB-LAMP의 검출민감도가 real-time PCR보다 낮음을 알 수 있었으며 그 기준을 대략 ct 값 30으로 볼 수 있었다.

## 5. 결론

본 연구를 통해 확인된 TB-LAMP의 민감도는 기존 연구와 비슷한 수준이었다. 도말검사에 비해 민감도가 월등히 높았고 배양검사와의 일치도도 높았다. TB-LAMP는 간단한 조작으로 검사가 가능하고 기존 핵산증폭검사에 비해서 검사시간이 짧은 장점이 있다. 검사실 수준이 높지 않고 전문인력이 갖춰지지 않은 곳에서도 검사를 시행할 수 있다. 따라서 보건소나 의원 같이 환자를 직접 접하는 일차의료 기관에서도 항산균 도말검사의 대체 검사로 이용이 가능하다고 판단된다. 또한 의료소외지역 및 오벽지, 교도소나 군부대와 같은 특수 시설에서도 사용이 적합하며 이동검진처럼 현장에서 신속하게 결과를 필요로 하는 경우에도 유용성이 높다.

## 6. 참고문헌

- 1) World Health Organization. Global Tuberculosis Control 2012. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2012/pdf/full\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2012/pdf/full_report.pdf).
- 2) Hong YP, Kim SJ, Lew WJ, Lee EK, Han YC. The seventh nationwide tuberculosis prevalence survey in Korea, 1995. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:27-36.
- 3) Weyer K, Mirzayev F, Migliori G, Van Gemert W, D'Ambrosio L, Zignol M, et al. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy-making and global implementation of Xpert(R)MTB/RIF. *Eur Respir J*. [Epub]
- 4) 결핵진료지침 (2014). 질병관리본부
- 5) Updated Guidelines for the Use of Nucleic Acid Amplification Tests in the Diagnosis of Tuberculosis. *MMWR* 2009;58:7-10.
- 6) Mitarai S, Okumura M, Toyota E, Yoshiyama T, Aono A, Sejimo A, Azuma Y, Sugahara K, Nagasawa T, Nagayama N, Yamane A, Yano R, Kokuto H, Morimoto K, Ueyama M, Kubota M, Yi R, Ogata H, Kudoh S, Mori T. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15:1211-7.
- 7) Ou X, Li Q, Xia H, Pang Y, Wang S, Zhao B, Song Y, Zhou Y, Zheng Y, Zhang Z, Zhang Z, Li J, Dong H, Zhang J, Kam KM, Chi J, Huan S, Chin DP, Zhao Y. Diagnostic accuracy of the PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county-level laboratory in China. *PLoS One*. 2014;9:e94544.