

분자 검사법을 통한 결핵의 진단과 내성 평가

울산대학교 의과대학 서울아산병원 호흡기내과

조경욱

Molecular Methods for Tuberculosis Diagnosis and Drug Resistance Assessment

Kyung-Wook Jo

*Division of Pulmonology and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine,
Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea*

This article reviews the principles and clinical interpretation of molecular diagnostic tests for tuberculosis, focusing on Xpert MTB/RIF Ultra, line probe assays, whole genome sequencing, and targeted next-generation sequencing. These molecular tools provide rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis* and its drug resistance profiles. Special attention is given to the discordance between genotypic and phenotypic drug susceptibility testing, including borderline resistance, heteroresistance, and rare genetic mutations. Understanding the strengths and limitations of each method is critical for accurate diagnosis, appropriate treatment selection, and improving patient outcomes. (**Korean J Med** 2025;100:122-127)

Key Words: Tuberculosis; Molecular diagnostic techniques; Drug resistance

서론

결핵은 전 세계적으로 여전히 높은 이환율과 사망률을 보이는 대표적인 감염성 질환이다. 폐결핵은 호흡기를 통해 전파되므로 결핵 환자를 신속하게 진단하는 것은 유병률과 발병률을 낮추는 데 핵심적인 역할을 한다. 특히 약제 감수성 결핵에 비해 치료가 더 까다로운 내성 결핵은 적절한 치료가 지연될 경우 예후가 나빠질 뿐 아니라 지역 사회 내 감염 확산의 위험도 높아진다. 따라서 결핵을 조기에 진단하고 내성 여부를 신속히 파악하는 것은 환자의 예후 개선은 물론 전파 차단과 사망률

감소라는 공중 보건 측면에서도 매우 중요하다.

기존의 표준 진단 방법인 항산균 배양 검사는 결핵균의 배양 여부를 확인하는 데 최대 2달 정도가 소요되는 단점이 있다. 또한 내성 여부를 확인하는 통상 감수성 검사는 항결핵제가 포함된 배지에 결핵균을 접종한 뒤 증식 여부를 관찰하여 약제 내성을 판별하는 방식으로 수행되기 때문에 결과 보고까지 상당한 시간이 소요된다. 기존 검사의 이런 한계로 인하여 결핵 진단과 내성 판별을 빠르게 수행할 수 있는 분자 검사법과 신속 감수성 검사가 도입되어 임상에서 중심적인 진단 도구로 자리 잡고 있다. 본 논문에서는 결핵의 진단과 내성 판별에 사용되는

Received: 2025. 4. 18 **Revised:** 2025. 5. 20 **Accepted:** 2025. 5. 26

Correspondence to:

Kyung-Wook Jo, M.D., Ph.D.

Division of Pulmonology and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, 88 Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea

Tel: +82-2-3010-6809, Fax: +82-2-3010-6968, E-mail: heathcliff6800@hanmail.net

Copyright©2025 The Korean Association of Internal Medicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

주요 분자 진단 검사법들에 대하여 고찰하고자 한다.

본 론

결핵균 분자 진단 검사

결핵균 분자 진단 검사는 결핵균에 특이적으로 존재하는 핵산의 특정 염기서열을 증폭하여 확인하는 방식으로 최근에는 민감도와 특이도가 높은 real-time polymerase chain reaction (PCR)이 결핵 진단에 널리 활용되고 있다. 통상적인 real-time PCR은 전처리와 농축이 완료된 검체를 다양한 상용 키트와 real-time thermocycler를 이용하여 증폭 및 검출하는 방식으로 여러 검체를 동시에 검사할 수 있고 비용이 저렴하다는 점이 장점이다. 그러나 검사의 시행 횟수에 제한이 있고 숙련된 검사 인력이 필요하며 결과 보고까지 시간이 소요된다. Xpert MTB/RIF 검사는 DNA 추출, 유전자 증폭, 결과 판독이 통합되어 있는 자동화된 real-time PCR 기반 검사로 검사 과정이 단순해서 숙련된 검사자가 필요하지 않다는 장점이 있다[1]. 또한 검체 접수 후 약 2시간 내에 결과를 보고할 수 있어 통상적인 real-time PCR을 대체하는 검사로 널리 사용되어 왔다.

최근 개발된 Xpert MTB/RIF Ultra는 기존의 Xpert MTB/RIF에 비해 민감도가 대폭 향상된 검사로 PCR 반응관의 용량이 25 µL에서 50 µL로 증가하였고 nested PCR 기법이 도입되어 더 많은 target DNA 증폭이 가능하다[2]. 또한 결핵균 특이 유전자인 *IS6110*과 *IS1081*을 동시에 탐지함으로써 *IS6110* copy 수가 적은 균주도 검출할 수 있다[2]. 이를 통해 결핵균 DNA가 극히 적은 경우에도 검출이 가능해서 검출 민감도가 기존 Xpert MTB/RIF의 112.6 CFU/mL와 대비하여 15.6 CFU/mL로 크게 향상되었다[2]. Xpert MTB/RIF Ultra와 Xpert MTB/RIF를 비교한 메타 분석에 따르면 Ultra 검사의 민감도는 기존 검사에 비해 더 높았으며(90.9% vs. 84.7%) 특히 도말 음성 검체에서 민감도 차이가 더 뚜렷하였다(77.5% vs. 60.6%) [3]. 다만, Xpert MTB/RIF Ultra 검사는 기존 검사에 비해 특이도가 2-3% 낮는데 이는 특히 과거에 결핵 치료를 받은 환자에서 더 두드러지므로 해석 시 주의가 필요하다[3].

리팜핀 내성의 95% 이상은 *rpoB* 유전자 내 돌연변이(mutation)에 의하여 발생하는데 이러한 변이의 대부분은 짧은 구간(hot spot)에 집중되어 있어 검출이 용이하다[4]. Xpert MTB/RIF 검사는 이 hot spot의 염기서열이 야생형(wild type)인지 여부를 판별함으로써 결핵균 존재 여부와 동시에 리팜핀 내성 여부도 진단할 수 있다. Xpert MTB/RIF 검사는 *rpoB* 유전자 돌연변이 확인을 위하여 증폭 threshold cycle (Ct)의 차이를 분석하는 delta Ct 방식이 사용되는 반면 Xpert MTB/RIF Ultra는 melting temperature (Tm) 기반 판독 방식을 사용한다. 이 방법은 *rpoB* 유전자를 네 개의 sloppy molecular beacon probe (*rpo1*, *rpo2*, *rpo3*, *rpo4*)를 통해 검출한 뒤 각 probe가 표적 염기서열과 결합하는 시점의 Tm을 측정하여 야생형과 돌연변이를 구별하는 원리로 돌연변이가 존재할 경우 해당 probe의 결합력이 감소하면서 Tm이 변화하거나 소실된다[2]. 이를 기반으로 Xpert MTB/RIF Ultra는 보다 민감한 내성 돌연변이 감지가 가능하다.

Xpert MTB/XDR은 이소니아지드, 플루오로퀴놀론, 주사제 등 리팜핀 외 주요 항결핵제에 대한 돌연변이를 동시에 탐지할 수 있는 새로운 분자 진단 검사로 기존 Xpert 플랫폼과 호환되며 약 90분 이내에 결과를 제공한다. 다기관에서 시행된 한 전향적 연구에서 이소니아지드 내성에 대한 민감도는 94%, 특이도는 100%였으며 플루오로퀴놀론은 각각 95%, 99%로 보고되었다[4]. 기존 분자 진단 검사로는 제한적이었던 2차 약제에 대한 내성을 빠르게 알 수 있는 장점이 있으나 베다퀼린이나 리네졸리드 등 최근 다제 내성 결핵에서 사용되는 핵심 약제에 대한 내성은 보고되지 않는다는 한계가 있다. World Health Organization (WHO)은 2022년에, 리팜핀 내성 결핵에서 이소니아지드, 플루오로퀴놀론 등 약제 내성 진단을 위한 초기 검사로 Xpert MTB/XDR을 권고하였다.

Xpert 검사 외에도 결핵균과 리팜핀을 포함한 주요 약제에 대한 내성을 동시에 검출할 수 있는 여러 분자 진단 검사들이 개발되었고 국내 식품의약품안전처(이하 식약처) 허가를 받았다(Anyplex™ II MTB/BDR Detection, cobas® MTB-RIF/INH, MAX™ MDR-TB, Standard™ M10 MDR-TB) [1].

Line probe assay

신속 감수성 검사는 결핵 내성과 관련된 특정 유전자의 돌연변이를 검출하는 유전자형 기반 검사이다. 리팜핀 내성이 대부분 *rpoB* 유전자 돌연변이와 관련되어 있는 것처럼 이소니아지드 내성 역시 *katG* (50-95%), *inhA* (20-35%), *ahpC* (10-15%) 등 일부 특정 유전자의 돌연변이와 밀접한 연관이 있음이 알려져 있다[5]. 따라서 이들 유전자 내 돌연변이를 확인함으로써 리팜핀과 이소니아지드에 대한 내성을 신속하게 진단할 수 있다.

여러 분자생물학적 기법 중 염기서열 분석이 가장 보편적으로 사용되는데 임상 현장에서는 line probe assay가 가장 널리 활용된다. Line probe assay는 특정 유전자 부위에 상보적으로 결합하는 야생형 probe와 돌연변이 probe를 이용하여 내성 관련 돌연변이를 탐지하는 reverse hybridization 기반 분자 진단 기술이다. PCR로 증폭된 결핵균 DNA를 니트로 셀룰로오스 막에 고정된 probe와 혼성화(hybridization)시켜 돌연변이의 유무를 시각적으로 확인하여 내성 여부를 판별한다[6]. Line probe assay는 통상 감수성 검사에 비해 검사 시간과 결과 보고까지 시간이 훨씬 짧기 때문에 치료 초기 단계에서 리팜핀과 이소니아지드에 대한 감수성 정보를 제공할 수 있어서 적절한 초기 치료 약제 선택에 중요한 역할을 한다. 다만 이 검사는 도말 양성 검체나 배양균에서만 시행 가능하므로 도말 음성 환자에서는 균 배양 전까지 사용이 어렵다는 한계가 있다. 또한 해당 약제와 관련된 모든 유전자 변이를 탐지하는 것이 아니므로 위음성 가능성이 있어서 결과 해석 시 주의가 필요하다.

First-line line probe assay는 리팜핀과 이소니아지드에 대해서 내성 판별이 가능한 반면 second-line line probe assay는 *gyrA/gyrB*와 *rrs/eis* 유전자 돌연변이를 검출함으로써 퀵론과 아미노글리코사이드계 항결핵제에 대해서 내성 판별이 가능하다. WHO는 리팜핀 내성 또는 다제 내성 결핵이 확인된 경우 second-line line probe assay를 초기 평가에 포함시킬 것을 권고하고 있으나 이 검사는 국내에서 아직 일상적인 진료 환경에서 사용되지 못하고 있는 실정이다. 다만 퀵론 내성의 경우 질병관리청 주관의 국가 지원 사업을 통한 *gyrA*와 *gyrB*

유전자 염기서열 분석으로 빠르게 내성 판별이 가능하고 리팜핀 또는 이소니아지드 내성으로 확인된 경우 의뢰가 가능하다.

Whole genome sequencing과 targeted next-generation sequencing

Whole genome sequencing은 결핵균의 전체 유전체를 분석하여 내성과 관련된 유전자 돌연변이를 더 민감하고 포괄적으로 탐지할 수 있는 차세대 분자 진단법이다. 기존 신속 감수성 검사의 타겟인 *rpoB*, *katG*, *gyrA*, *rrs* 등의 유전자뿐 아니라, *embB*, *ethA*, *pncA*와 같은 다양한 유전자의 돌연변이도 분석이 가능하다. 이에 따라 대부분의 항결핵제에 대해 내성 예측이 가능하며 평균 예측 정확도는 90-98%로 매우 높은 수준이다[7]. 영국과 유럽의 다기관 연구에 따르면 whole genome sequencing 기반 진단은 기존의 통상 감수성 검사에 비해 결과 보고가 평균 21일 이상 빠르며 약제 내성 예측 정확도는 평균 93% 이상으로 보고되었다[7]. 이에 영국 보건 당국은 2017년부터 whole genome sequencing 기반 결핵 진단을 표준 진단법으로 채택하였고 검사 후 5-7일 이내에 내성과 전파 관련성 등을 포함한 종합 보고서를 제공하고 있다. Whole genome sequencing은 이 외에도 전파 경로 추적, 계통 분석, 집단 발생 조사 등 역학 분석에서도 활용될 수 있다. 다만 검사에 소요되는 시간과 비용, 결과 해석의 복잡성 등으로 인하여 국내에서는 아직 진료 현장에서 활용되고 있지는 않다.

최근에는 whole genome sequencing에 비해 검사 시간이 짧고 비용이 낮으며 해석이 상대적으로 간편한 targeted next-generation sequencing 기법도 주목받고 있다. 이는 특정 항결핵제 내성과 관련된 유전자들(*rpoB*, *katG*, *gyrA*, *rrs* 등)을 panel 형태로 설정하여 해당 부위만을 대상으로 고감도의 염기서열 분석을 수행하는 방식이다. 최근 발표된 메타 분석에서 124개 연구를 분석한 결과 targeted next-generation sequencing은 리팜핀(민감도, 99.1%; 특이도, 97.6%)과 이소니아지드(민감도, 95.6%; 특이도, 98.9%)를 비롯한 여러 약제에 대해 높은 진단 정확도를 보였다[8]. 또한 배양 검체뿐 아니라 임상 검체에서 직접 수행해도 진단률이 비슷해서 기존 검사에 비해 더 빠르게 약제 내성 정보를 제공할 수 있음

을 보고하였다[8]. 이에 따라 2024년 3월 WHO는 targeted next-generation sequencing을 약제 내성 결핵의 유전자형 감별을 위한 진단법으로 공식 권고하였다.

신속 감수성 검사와 통상 감수성 검사의 불일치

항결핵제 감수성 검사의 전통적인 gold standard인 통상 감수성 검사와 분자 진단 검사 또는 line probe assay법을 이용한 신속 감수성 검사는 다음과 같은 몇 가지 요인들로 인하여 검사 간 불일치가 발생할 수 있다.

Borderline resistance *rpoB* mutation

국내에서는 주로 Löwenstein-Jensen 고체 배지를 기반으로 한 절대 농도법을 통해 통상 감수성 검사를 시행하고 있으며 리팜핀은 40 µg/mL 단일 기준 농도를 적용하여 감수성 여부를 판정한다. 그러나 *L511P*와 같은 일부 *rpoB*유전자 돌연변이는 리팜핀에 대하여 low-level resistance를 유발하는데 이 경우 최소 억제 농도는 감수성 균주에 비해 증가하지만 통상 감수성 검사의 내성 기준 농도에는 미치지 않아 감수성으로 판

정될 수 있다[9]. 하지만 유전자에 돌연변이를 가지고 있으므로 신속 감수성 검사에서는 내성으로 분류되어 검사 간 불일치가 발생하게 된다.

국내 한 연구에서 리팜핀 내성으로 분류된 임상 균주의 최소 6.9%에서 borderline resistance 관련 *rpoB*유전자 돌연변이가 확인되었음이 보고되어 borderline resistance에 의한 불일치가 드문 현상이 아님을 시사하였다[9]. Borderline resistance를 보이는 균주는 표준 용량 리팜핀(10 mg/kg)이 포함된 치료제로 치료할 경우 치료 실패 가능성이 높다. 따라서 1차 결핵 치료제로 치료해서는 안 되고 고용량 리팜핀이 포함된 치료제 또는 리팜핀 내성 결핵에 준한 치료 전략이 필요할 수 있으므로 신속/통상 감수성 검사가 불일치하는 원인을 정확히 파악하는 것이 중요하다. Borderline resistance를 확인하기 위해서는 *rpoB*유전자의 염기서열 분석이 필요하며 현재 국내에서는 결핵연구원을 포함한 몇 기관에서 *rpoB*유전자 염기서열 분석이 임상 검사로 가능하다.

Heteroresistance

한 환자에서 약제 감수성 결핵균과 내성 결핵균이 동시에 존

Table 1. Principles, diagnostic performance, and limitations of molecular tests for tuberculosis and drug resistance

Test method	Testing principle	Sensitivity	Specificity	Turnaround time	Limitation
Xpert MTB/RIF Ultra	Nested real-time PCR/ melting temperature	90.9% (결핵균 검출) 94% (리팜핀 내성)	96% (결핵균 검출) 98% (리팜핀 내성)	2시간 이내	이전 결핵력 있는 환자에서 위양성 가능 리팜핀 외 다른 약제 내성은 평가 불가
Xpert MTB/XDR	Real-time PCR 기반 자동화된 nucleic acid amplification test	98.3% (이소니아지드 내성) 91.4% (플루오로퀴놀론 내성)	95.0% (이소니아지드 내성) 98.5% (플루오로퀴놀론 내성)	2시간 이내	베다퀼린, 리네졸리드 등 다제 내성 결핵 주요 약제 내성은 검출 불가
First-line line probe assay	PCR, hybridization	84% (이소니아지드 내성) 98% (리팜핀 내성)	99% (이소니아지드 내성) 99% (리팜핀 내성)	5시간	도말 양성 검체 또는 배양균 검체에서만 검사 가능 드문 돌연변이는 검출 어려움
Second-line line probe assay	PCR, hybridization	86% (플루오로퀴놀론 내성) 87% (주사제 내성)	99% (플루오로퀴놀론 내성) 99% (주사제 내성)	5시간	도말 양성 검체 또는 배양균 검체에서만 검사 가능 드문 돌연변이는 검출 어려움
Whole-genome sequencing	유전체 전체의 염기서열 분석	92.3% (평균)	98.4% (평균)	7-10일	고비용 결과 해석이 복잡하고 많은 시간이 소요됨
Targeted next generation sequencing	항결핵제 내성 특이 유전자에 대한 염기서열 분석	95.6% (이소니아지드 내성) 99.1% (리팜핀 내성)	98.9% (이소니아지드 내성) 97.6% (리팜핀 내성)	2-5일	일부 표적 유전자에만 한정된 염기서열 분석

PCR, polymerase chain reaction.

재하는 현상을 heteroresistance라 하며 신속 감수성 검사와 통상 감수성 검사 간 결과 불일치의 주요 원인 중 하나로 알려져 있다[10]. 국내 환자에서 정확한 빈도는 명확하지 않지만 일부 해외 연구에서는 최대 20%에 달하는 비교적 높은 빈도가 보고된 바 있다[10]. 따라서 통상 감수성 검사에서는 감수성으로, 신속 감수성 검사에서는 내성으로 나타나는 경우 border-line resistance와 함께 반드시 감별이 필요한 원인이다.

Heteroresistance는 line probe assay에서 특정 유전자에 대한 돌연변이 probe와 해당 부위의 야생형 probe가 동시에 검출되는 양상으로 나타날 수 있다. 따라서 감수성 검사 결과 간 불일치가 보고된 경우 line probe assay의 실제 결과지를 직접 확인하는 것이 heteroresistance 감별에 도움이 될 수 있다.

드문 유전자 변이

이소니아지드 내성과 관련된 돌연변이는 주로 *katG*, *inhA*, *ahpC* 유전자에서 발생하며 전체의 약 80% 정도를 차지한다. 나머지 내성은 *kasA*, *mshA*, *ndh* 등의 유전자에서 발생하는 드문 변이에 의하여 나타날 수 있으나 현재 사용 중인 신속 감수성 검사로는 이러한 변이는 확인할 수 없다. 이와 유사하게 리팜핀 내성 역시 *rpoC*와 같이 *rpoB*가 아닌 다른 유전자 돌연변이에 의하여 발생할 수 있는데 이 또한 Xpert MTB/RIF Ultra나 line probe assay로는 검출되지 않는다. 이런 경우 신속 감수성 검사에서는 감수성으로 나타나지만 통상 감수성 검사에서는 내성으로 확인될 수 있으므로 두 검사 간 불일치의 원인이 될 수 있다. 이러한 드문 돌연변이 여부를 정확히 확인하기 위해서는 whole genome sequencing이 필요하다는 한계점이 있다.

결론

결핵 진단에서 분자 진단 검사법은 기존의 검사에 비해 더 신속하고 정밀한 정보를 제공하며 특히 약제 내성 여부를 조기에 파악하는 데 뚜렷한 장점을 가진다. Xpert MTB/RIF Ultra와 line probe assay는 현재 임상 현장에서 널리 사용되는 약제 내성 신속 진단 검사법이고 whole genome sequencing과 targeted next-generation sequencing은 진단과 내성 판별에

서 새로운 검사법으로 주목받고 있다. 표 1은 각 검사법의 검사 원리, 진단율과 한계점을 정리한 것으로 이러한 특성을 정확히 이해하고 임상 상황에 적절히 해석 및 적용할 수 있을 때 진단 정확도는 물론 치료 성과 또한 향상될 수 있을 것이다.

중심 단어: 결핵; 분자 검사법; 약제 내성

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

FUNDING

None.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Kyung-Wook Jo wrote and reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

None.

REFERENCES

1. Joint Committee for the Revision of Korean Guidelines for Tuberculosis. Korean guidelines for tuberculosis. 5th ed. Cheongju: Korea Disease Control and Prevention Agency, 2024.
2. Chakravorty S, Simmons AM, Rownecki M, et al. The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio* 2017;8:e00812-17.
3. Zifodya JS, Kreniske JS, Schiller I, et al. Xpert Ultra versus Xpert MTB/RIF for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults with presumptive pulmonary tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2021;2:CD009593.
4. Penn-Nicholson A, Georgiou SB, Ciobanu N, et al. Detection of isoniazid, fluoroquinolone, ethionamide, amikacin, kanamycin, and capreomycin resistance by the Xpert MTB/XDR assay: a cross-sectional multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis* 2022;22:242-249.
5. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuber-*

- culosis: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015;19:1276-1289.
6. Lin SY, Desmond EP. Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance. *Clin Lab Med* 2014;34:297-314.
 7. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015;15:1193-1202.
 8. Schwab TC, Perrig L, Göller PC, et al. Targeted next-generation sequencing to diagnose drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2024;24:1162-1176.
 9. Jo KW, Lee S, Kang MR, Sung H, Kim MN, Shim TS. Frequency and type of disputed *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korea. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2017;80:270-276.
 10. Hofmann-Thiel S, van Ingen J, Feldmann K, et al. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan. *Eur Respir J* 2009;33:368-374.