

염기서열결정과 Line Probe 분석법에 의한 Rifampin내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 분석

부산대학교 의과대학 내과학교실, 국립마산결핵병원*

이민기, 김윤성, 이호진, 전두수, 윤상명, 박삼석, 김철민*, 박순규

= Abstract =

Analysis of *rpoB* Gene in Rifampin-Resistant *M. Tuberculosis* by Direct Sequencing and Line Probe Assay

Min Ki Lee, M.D., Yun Seong Kim, M.D., Hyo Jin Lee, M.D., Du Su Cheon, M.D.,
Sang Myung Yun, M.D., Sam Seok Park, M.D., Cheol Min Kim M.D.*, Soon Kew Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Pusan National University and
National Masan Tuberculosis Hospital*, Pusan, Korea

Background : The emergence of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* presents a significant challenge to the treatment and control of tuberculosis, and there is an urgent need to understand the mechanisms by which strains acquire multidrug resistance. Recent advances in molecular methods for the detection of *M. tuberculosis* genetic targets have approached the sensitivity of culture. Furthermore the prospect of determining resistance in mycobacteria at the nucleic acid level particularly to first-line drugs like rifampin, isoniazid has provided a glimpse of the next generation of sensitivity test for *M. tuberculosis*. Previous studies in RMP resistant *M. tuberculosis* have shown that mutation in β subunit of RNA polymerase is main mechanism of resistance.

Method : In this study, *rpoB* gene for the β subunit of RNA polymerase from *M. tuberculosis* of 42 cultured samples (32 were RMP resistant and 10 were sensitive cases) were isolated and characterised the mutations. Direct sequencing data were compared with the results of INNO-LiPA Line Probe Assay (LiPA, Innogenetics, Belgium), commercial RMP resistance detecting kit using reverse hybridization method.

Results : All of the RMP resistant samples were revealed the presence of mutation by LiPA. In 22 samples (68.8%) out of 32 RMP resistant cases, the mutation types were confirmed by the positive signal at one of 4 mutation bands in the strip. The most frequent type was R5 (S531L) which were 17 cases (77.3%). Results of direct sequencing were identified the exact characteristics of 8 mutations which were not confirmed by LiPA. S522W type point mutation and 9 base pair deletion at codon 513~515 were new identified mutations for the first time.

Conclusion : Mutations in *rpoB* gene is the main mechanism of RMP resistance in *M. tuberculosis* and LiPA is a very useful diagnostic tool for the early diagnosis of RMP resistance in *M. tuberculosis*.

Key Words : multidrug-resistant, *rpoB*, LiPA, rifampin, *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis.

서 론

결핵은 인간에게 있어서 가장 흔한 감염성 질환중의 하나이며, 전 인류의 약 1/3이 *Mycobacterium tuberculosis*에 감염되어 있고, 세계적으로 매년 8백만 명의 신환이 발생하며 이로 인한 사망자 수는 3백만 명에 달하는 대단히 심각한 공중보건학적인 문제를 야기하는 질환이다¹⁾.

1995년에 시행된 우리나라의 제 7차 전국결핵실태조사 결과에 따르면 흉부 엑스선상 활동성 폐결핵의 유병율은 1.03%, 균양성 폐결핵의 유병율은 0.22%로 이것을 환자수로 따지면 각각 429,000명 및 91,000명으로 추정된다. 그리고 약제내성율을 살펴보면 한가지 이상의 약제에 대한 내성율은 9.9%이고, isoniazid(INH)를 포함한 2가지 이상의 약제내성율은 INH와 rifampin(RMP)이 5.3%로 가장 높은 빈도를 보였고 치료력이 없는 환자 가운데서 약제내성율은 5.8%, 치료력이 있는 환자에서 내성율은 25%로 보고되었다²⁾.

약제내성중에서 결핵치료의 근간을 이루는 INH와 RMP를 포함한 2가지 이상의 약제에 내성을 보이는 경우 다제내성결핵(multidrug-resistant tuberculosis)으로 정의되며³⁾, 비록 결핵유병율이 감소하는 추세에 있다하더라도 다제내성결핵균의 증가는 치료에 큰 장애가 되고 있으며 결핵의 진단과 치료에 대한 연구에 보다 많은 노력이 필요한 실정이다.

외국의 경우 결핵유병율이 꾸준히 감소하는 추세였으나 1985년을 기점으로 역전되기 시작하여 1985년부터 1991년까지 예상증가치보다 39,000명의 더 많은 환자가 발생된 것으로 보고되고 있다⁴⁾. 또한 단순한 숫자의 증가 뿐만 아니라 약제내성균의 빈도도 같이 증가되는 추세를 보이며^{5,6)}, 다제내성균의 집단감

염 및 원내감염의 보고가 증가되고 있다^{7,8)}. 이러한 결핵의 증가 특히 다제내성결핵균에 의한 감염이 문제됨으로 인해 결핵환자의 조기발견과 즉각적이고도 적절하며 충분히 치료하는 것이 재강조된다. 또한 초기에 분리된 모든 결핵균에 대한 약제감수성 검사를 실시해야하고 그 결과를 보고해야 한다고 주장되고 있다⁹⁾. 많은 검사실에서 실시되는 표준적인 결핵균 검출방법은 우선 항산균 도말법이나 조직의 항산균 염색을 실시한 후 균배양을 하고 배양된 균에서 결핵임을 확인하기위한 생화학적 검사를 시행한다¹⁰⁾. 이 과정은 검체채취로부터 결핵균 동정시까지 4~6주가 소요되며, 이는 12~18시간이나 걸리는 병원성 mycobacterium의 세대시간에 기인한다. 배양된 균의 약제감수성 여부를 알아보는 데는 2~4주가 더 필요하다. 따라서 약제감수성 검사 결과가 의사의 손에 도달했을 때는 면역기능이 저하된 환자의 경우 이미 다제내성균에 의해 사망하고 난 뒤인 경우도 생기는 것이다. 이상의 관점에서 볼 때 결핵자체의 빠른 진단과 조속한 약제내성 여부의 확인으로 효과적인 결핵치료를 가능케하는 검사법이 절실히 요구된다.

RMP은 INH와 함께 결핵치료의 근간을 이루는 중요한 약제이며 1971년부터 사용되기 시작한 중요한 항결핵제제이다¹¹⁾. 이 두약제에 동시내성을 지닌 환자 134예를 대상으로 치료한 성적에 따르면 87예(65%)가 치료에 반응하였고 47예(35%)는 실패하였으며 과거에 사용한 약제가 많을수록, 그리고 성별이 남자인 경우에 실패율이 높았으며³⁾, 다른 연구에서도 치료실패율은 40~70%로 보고되고 있다¹²⁾. Mitchison 등³⁾의 연구에 의하면 RMP 내성을 보일 경우 치료기간이 더 길어지고 예후가 불량함을 보고하였다. 현재까지 보고된 RMP을 제외한 다른 약제의 내성기전을 살펴보면 INH의 경우 Zhang 등¹⁴⁾이 결핵균이 내성

을 획득하는 기전의 하나로서 catalase-peroxidase 효소의 유전자인 *katG* 유전자의 소실을 보고하였다. 또한 Banerjee 등¹⁵⁾은 새로운 기전으로서 지방산 생합성에 관여하는 *inhA* 유전자의 돌연변이가 INH와 ethionamide의 약제내성과 관련이 있고, 20~25%의 INH 내성균에서 *inhA* 유전자의 돌연변이가 있음을 보고하였다. 또한 streptomycin의 내성은 16S rRNA의 유전자인 *rrs*와 ribosomal 단백질 S12의 유전자인 *rpsL*¹⁶⁾, fluoroquinolone 내성은 DNA gyrase 유전자인 *gyrA*¹⁷⁾의 점돌연변이에 의하는 것으로 보고되고 있다. 결핵균에서 약제내성과 관련된 plasmid나 transposon은 현재까지 보고를 참조할 때 내성기전과는 관련이 없는 것으로 생각된다¹⁸⁾. RMP의 작용 기전은 세균의 RNA polymerase에 작용하여 전사(transcription)를 방해하는 것으로 알려져 있고, Jin 등¹⁹⁾이 *E. coli*에서 연구한 결과에 의하면 RNA polymerase는 4개의 subunit($\alpha_2\beta\beta'$)로 구성되고 RNA 합성의 시작과 연장에 관련이 있으며, 이중 특히 β subunit(*rpoB*)의 중심부분에 돌연변이가 몰려 있어 RMP 내성의 원인이 됨을 보고하였다. 이후 Honore 등²⁰⁾에 의해 *Mycobacterium leprae*, 그리고 Telenti 등²¹⁾에 의해 *Mycobacterium tuberculosis*의 RMP 내성의 유전학적인 돌연변이의 기전이 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 있다는 것이 보고되었으며 최근에는 이를 바탕으로 Beenhouwer 등²²⁾에 의해 역교잡법(reverse hybridization)을 이용한 상용화된 RMP 내성 확인 검사인 INNO-LiPA Line Probe Assay(LiPA)에 대한 보고가 있었다. 본 연구는 다제내성결핵을 조기 진단하고 약제감수성 여부를 신속히 결정하여 효과적인 치료와 다제내성균의 출현을 최대한으로 억제하여 궁극적으로 결핵을 박멸하기 위한 기초 연구로서, INH와 함께 항결핵제의 근간을 이루며 현재까지의 보고로 볼 때 분자 생물학적인 내성 진단법의 개발 가능성이 가장 높은 RMP의 조기 검출 방법을 확립하고자 하였다. 아울러 내성 관련 유전자의 돌연변이를 분석하고 외국의 경우와 비교하여 한국인에서의 특성을 규명하고 이를 LiPA와

비교하여 문헌 고찰과 함께 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 대상

부산대학교병원 및 국립마산결핵병원을 내원하여 결핵으로 추정되어 객담 항산균 도말 및 배양검사를 실시한 환자의 세균배양균주중에서 임의로 42예를 선택하였다. 32예는 RMP 내성이며, 10예는 RMP 감수성이었다. 임상 가검물 채취와 기본적인 결핵균 동정법(항산균 도말) 및 세균배양과 약제감수성 검사과정은 WHO에서 제시한 방법에 의하여 병리 검사실에서 통상적으로 실시하는 방법에 따랐다¹⁰⁾.

2. DNA 추출

배양된 균집락을 인산완충액에 부유시킨 뒤 균 부유액 20 μ l를 취하여 1.5ml 미세원심관에 옮긴 후 원심분리기에서 12,000 rpm으로 1분간 원심하고 BioRad (U.S.A)사의 InstaGene™ matrix를 100 μ l가하여 항온수조에서 56℃로 30분간 반응시키고 100℃에서 8분간 더 반응시켰다. 12,000 rpm으로 3분간 원심하여 상층액 5 μ l를 20 μ l 규모의 PCR에 사용하였다.

3. PCR에 의한 *rpoB* 유전자 증폭

Primer 중 *rpoB*1, *rpoB*2, *rpoB*3, *rpoB*4는 보고된 염기 서열을 참고하여²¹⁾ 표 1과 같이 결정된 oligonucleotide를 (주)한국생공에 주문하여 사용하였다. PCR 반응 혼합액은 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200mM dATP, 200mM dCTP, 200mM dGTP, 200mM dTTP와 10pmol씩의 각 primer 및 1 unit의 Taq DNA polymerase로 구성되었고, template DNA 5 μ l와 함께 총 25 μ l가 되게 하여 mineral oil을 25

μl 증충하였다. Ericomp(U.S.A.)사의 single block thermal cycler로 우선 94°C에서 5분간 가열 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간씩 30 주기를 반복하고 마지막에 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. 이차 PCR시에는 일차 PCR 산물을 1 μl 사용하고 4 μl 를 증류수로 보충해주는 외에는 일차 PCR과 같은 조건에서 반응을 실시하였다. LiPA를 위한 이차 PCR시에는 kit에 포함된 amplification buffer를 4 μl , biotin-labelled nested primer를 4 μl , MgCl₂ 용액을 4 μl 및 Taq polymerase 0.5 μl 와 함께 일차 PCR 산물 1 μl , 증류수 6.5 μl 로 20 μl 를 맞추어 mineral oil 25 μl 를 증충하였다. PCR 반응은 일차 PCR과 같은 조건으로 실시하였다. LiPA를 위한 이차 PCR primers (rpob5와 rpob6)는 biotin이 결합되어 있고 257bp의 산물이 만들어지도록 하였다.

PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 TAE 완충액(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)으로 100V에서 30분간 전기영동하고 자외선 투시기로 특이적인 산물이 생성되었음을 확인한 후 직접염기서열 결정 및 LiPA에 이용하였다.

4. DNA 염기서열 결정

염기서열 분석은 방사선동위원소법으로 하였다. [γ -³²

P]ATP (3000Ci/mmol; 10mCi/ml)로 radiolabelling한 뒤 fmol™ DNA Sequencing System을 사용하여 분석하였다. 반응액이 든 원심관을 미리 95°C로 가열되어 있는 thermal cycler에 설치하고 95°C에서 2분 가열 후에 95°C 30초, 42°C 30초, 72°C 1분을 40주기 실시하고 반응이 끝나면 fmol™ sequencing stop 용액을 3 μl 가하여 반응을 정지시켰으며 30W의 일정 전력으로 2시간동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 유리판을 분리시킨 다음 gel을 Watmann 3M 여과지에 옮겨 붙여서 gel 건조기로 80°C로 가열하면서 2시간동안 감압 건조시켰다. 건조된 gel은 랩으로 감싸서 KODAK XAR-5 필름과 함께 카세트에 넣어 12~24시간동안 실온 또는 영하 70°C에 두었다가 자동 현상기로 현상하였다.

5. Line Probe Assay (LiPA)

(1) 변성(denaturation) 및 교잡(hybridization)

Biotin이 결합된 채 증폭된 이차 PCR 산물 10 μl 와 변성액(denaturation solution) 10 μl 를 홈통(trough)에 분주하여 20°C~25°C에서 5분간 예비 반응 시킨후 미리 37°C~62°C로 예열된 교잡액(hybridization solution)을 1ml 가하여 섞은 뒤 LiPA strip을 잠기게 하여 진탕항온수조에서 62°C로 30분간 약 80rpm 속도로 진탕하면서 교잡반응시켰다.

Table 1. Primers Used in *rpob* Amplification

PCR	Size	Primer name	Sequence
primary	411bp	rpob1	5'-TACGGTCGGCGAGCTGATCC-3'
		rpob2	5'-TACGGCGTTTCGATGAACC-3'
secondary (unlabelled)	157bp	rpob3	5'-TGCACGTCGCGACCTCCA-3'
		rpob4	5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3'
secondary (biotin-labelled)	257bp	rpob5	5'-GGTCGGCATGTCGCGGATGG-3'
		rpob6	5'-GACGTCGCGACCTCCAGC-3'

(2) 세척(stringent washing)

Strip이 잠겨있는 변성액과 교잡액을 모두 제거하고 37℃~62℃로 예열된 세척액(wash solution) 1ml를 가하여 10~20초간 흔들어주면서 세척하고, 한번 더 반복 세척 후 세척액을 가하여 62℃에서 10분간 다시 진탕항온수조에서 진탕하면서 세척시켰다.

(3) 발색반응(color development)

헹굼액(rinse solution) 1ml로 1분간씩 2회 헹군 후 회색된 conjugate액(conjugate solution, conjugate 농축액을 conjugate회색액으로 100배 희석함) 1ml를 분주하여 진탕교반기로 약 160rpm의 속도로 진탕하면서 20℃~25℃에서 30분간 흔들어주면서 반응시켰다. Conjugate액을 제거하고 기질완충액(substrate buffer) 1ml로 1분간 세척 후에 기질액(substrate solution, 기질 농축액을 기질완충액으로 100배 희석함) 1ml를 가하여 진탕하면서 20℃~25℃에서 30분간 반응시켰다. 기질액을 제거하고 증류수 1ml를 가하여 진탕하면서 20℃~25℃에서 30분간 더 반응시킨 후 strip을 건져 건조시켰다.

(4) 결과 판독(interpretation of strips)

LiPA는 역교잡(reverse hybridization)의 원리를 이용한 것으로서 oligonucleotide probes가 nitrocellulose strip에 일렬로 지정된 위치에 미리 결합되어 있고 여기에 biotin이 결합된 PCR 산물이 특이적으로 결합하면 biotin에 streptavidin이 결합되며, 이때 함께 결합되어 있던 alkaline phosphatase에 의하여 chromogen인 NBT/BCIP가 자색으로 변하는 성질을 이용한다. 그림 1의 panel A와 같이 첫째 띠는 발색반응을 확인하는 양성대조 띠이며, 둘째 띠는 증폭된 PCR 산물이 *M. tuberculosis* 균의 균에서 유래된 것임을 확인하는 probe이고, S1에서 S5까지의 띠는 약제감수성균의 정상 유전자 배열에 결합하는 wild-type probe이며, R2, R4a, R4b 및 R5 띠는 비교적 빈도가 높은 것으로 알려져 있는 4종의 점돌연변이에 특이적인 mutant-probe이다. Wild-type probe는

codon 509에서 codon 534까지 모두 확인할 수 있도록 중첩되게 설계되어 있으므로 이 지역에서 돌연변이가 있을 경우에는 해당되는 위치의 S probe에 PCR 산물이 결합하지 못하므로 발색을 나타내지 못하게 된다. 즉 발색되지 않은 띠가 있을 경우에는 해당 probe의 위치에 돌연변이가 있는 RMP 내성균이고, 모두 발색 띠를 나타낸 경우에는 돌연변이가 없는 RMP 감수성균을 의미한다. 그러나 S 띠들 만으로는 정확한 돌연변이의 종류는 알 수가 없으며, R2, R4a, R4b 또는 R5 띠중 대응되는 mutant-probe에서 발색되지 않는 띠가 있을 경우에만 정확한 돌연변이 유형을 알 수 있다. 이 때 R2, R4a, R4b 또는 R5 띠에 발색 띠가 나타날 경우에는 각각 D516Y, H526Y, H526D 또는 S531L의 점돌연변이가 있음을 의미한다.

결 과

1. 특이적인 이차 PCR 산물의 생산

42검체 가운데 RMP 내성인 32균주는 RMP과 INH에 동시에 내성인 다제내성균주였고, 10검체는 약제감수성 검사에서 단 하나의 약제에도 내성을 나타내지 아니한 감수성 균주였다. RNA polymerase의 β subunit를 coding하는 *rpoB* 유전자의 codon 511에서 codon 533에 이르는 69bp(base pairs)를 포함하는 157bp를 증폭할 수 있도록 *rpob1*, *rpob2*, *rpob3*, 및 *rpob4* primers를 준비하여 PCR을 실시하였다(표 1). 이차 PCR 결과를 전기영동과 ethidium bromide 염색 후에 자외선 투시기 상에서 확인하고 157bp의 띠만을 잘라내어 DNA를 정제하여 DNA 염기서열결정에 이용하였다.

LiPA를 위해서는 *rpob5* 및 *rpob6* primers를 사용하였으며, 전기영동과 ethidium bromide 염색 후에 자외선 투시기 상에서 보아 특이적인 257bp의 띠가 나오면 비특이적인 띠의 존재 여부에 관계없이 LiPA를 실시하였으며 그 결과를 그림 1-B에 나타

내었다.

2. Line Probe Assay (LiPA)에 의한 *rpoB* 유전자 다형성 분석

RMP 감수성 균주 10예 전에서 LiPA 결과는 S1~S5 띠가 모두 발색을 나타내어 돌연변이가 없는 wild-type의 *rpoB*임을 알 수 있었다(그림 1. Panel B, 0). RMP 내성 균주 32예는 모두 S1~S5 띠 중 하나 이상이 발색을 나타내지 않아서 돌연변이를 가지고 있는 것으로 나타났다(Panel B, 1~9). 이 중 22예(68.8%)는 R띠의 발색이 동반되어 정확한 돌연변

이 유형을 알 수 있었으나 10예(31.3%)에서는 R띠의 발색이 동반되지 않아 정확한 돌연변이 유형을 알 수는 없었다. 그러나 각각 S1과 S2에 공통인 지역에 돌연변이가 있는 것으로 추정되는 경우 (Δ S1, S2)가 1예(Panel B, 9)였고, S2지역에 돌연변이가 있는 것으로 추정되는 경우(Δ S2)가 1예 (Panel B, 1), Δ S3가 3예(Panel B, 3), Δ S4가 3예(Panel B, 6) 및 Δ S5가 2예(Panel B, 8)였다. 따라서 LiPA 결과 RMP 내성 결핵균에는 최소한 5종류 이상의 돌연변이가 *rpoB* 유전자에 존재할 것으로 추정되었다.

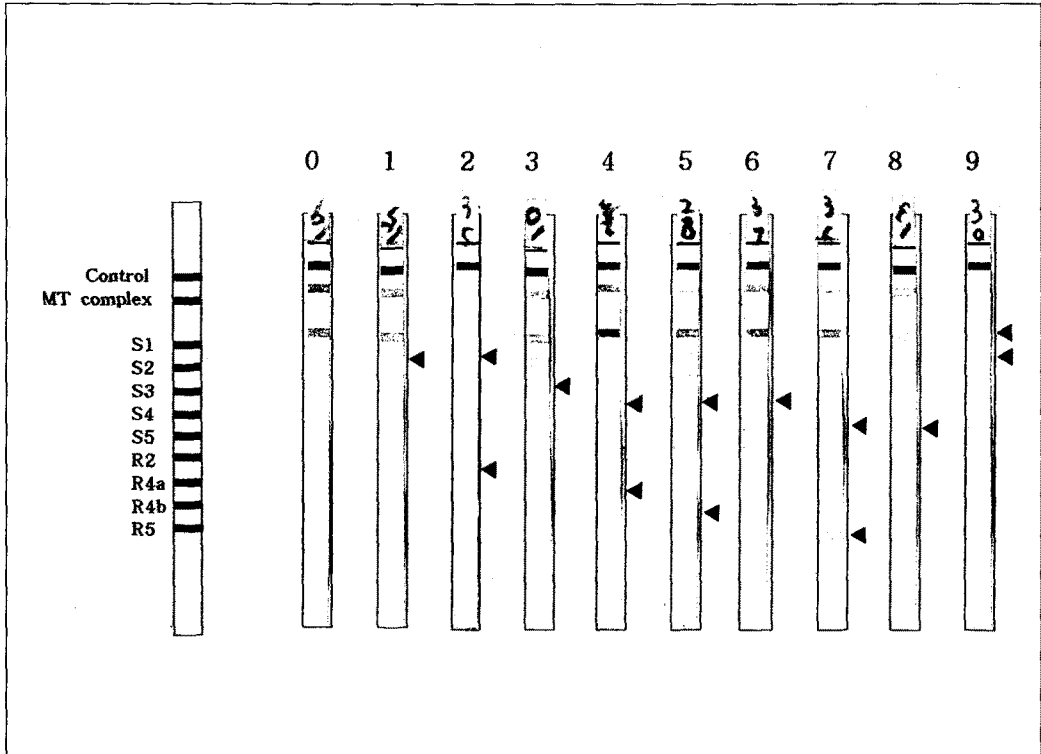


Fig. 1. Strip design and representative results obtained with the Line Probe Assay (LiPA) strips.

The location of the consecutive lines on the strips are schematically represented in panel A. In panel B examples of LiPA strips are shown. Strip 0 represent sensitive pattern. Strip 1 to 9 represent resistant patterns. Arrow heads represent each specific mutation sites. (1- Δ S2, 2-R2, 3- Δ S3, 4-R4a, 5-R4b, 6- Δ S4, 7-R5, 8- Δ S5, 9- Δ S1-2)

돌연변이의 유형을 알 수 있었던 22예 중 17예(77.3%)는 R5형(Panel B, 7)으로서 돌연변이 유형은 codon 531의 두 번째 염기가 C에서 T로 염기전환되어 아미노산은 serine이 leucine으로 치환된 경우(S531L)였다. 다음으로는 R4a형(Panel B, 4)이 3예(13.6%)로서 codon 526의 첫째 염기가 C에서 T로 염기전환되어 아미노산은 histidine이 tyrosine으로 치환된 경우(H526Y)였으며, R2형(Panel B, 2)이 1예(4.5%)로서 codon 516의 두 번째 염기가 A에서 T로 염기전환되어 아미노산은 aspartate에서 valine으로 치환된 경우(D516V)였고, R4b형(Panel B, 5)도 1예(4.5%)로서 codon 526의 첫째 염기가 C에서 G로 염기전환되어 아미노산은 histidine이 asparagine으로 치환된 경우(H526D)였다. 상기 결과를 표 2에 요약하였다.

LiPA 분석시 S, R5 및 ΔS5형에서는 R4a띠가 약하지만 함께 발색되는 경우가 있어 판독에 주의를 요하였다. 이들 검체를 특히 주의하여 직접염기서열 결정을 실시하여 확인해 본 결과 R4a띠는 돌연변이가 아니면서 발색이 되는 경우임이 밝혀졌다. 따라서 이들 유형에서의 판독에 주의를 기울일 필요가 있었다. LiPA에서 돌연변이가 확인되지 않은 경우는 물론이고 확인된 경우에도 모두 직접염기서열 결정을 실시하여 정확한 돌연변이의 유형을 알아내고 LiPA의 정확성을 검증해 보았다.

3. DNA 염기서열결정에 의한 *rpoB* 유전자 다형성 분석

이차 PCR 산물을 전기영동후 157bp의 띠를 잘라내어 정제후 cycle sequencing법에 의하여 염기서열을 결정하여 그 결과를 표 2에 요약하였고, 일부 결과를 그림 2와 그림 3에 나타내었다.

직접염기서열 분석 결과 감수성인 균주의 경우 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 관찰되지 않은 정상 염기서열을 보였다. 내성균주인 경우 11종의 점돌연변이와 1종의 9bp 결실이 관찰되어 합해서 12종의

rpoB 유전자 돌연변이가 결핵균의 RMP 내성 획득에 관여하는 것으로 밝혀졌다(표 2). LiPA 분석에서 돌연변이가 확인된 S531L, H526Y, H526D 및 D516V등은 염기서열 분석 결과 모두 일치하는 것으로 밝혀졌고, LiPA 분석에서 정확히 나타낼 수 없었던 돌연변이들도 그 위치는 LiPA 분석 결과와 일치하였다(그림 2). LiPA에서 돌연변이가 확인되지 않은 경우를 보면, S1과 S2에 공통인 지역에 돌연변이가

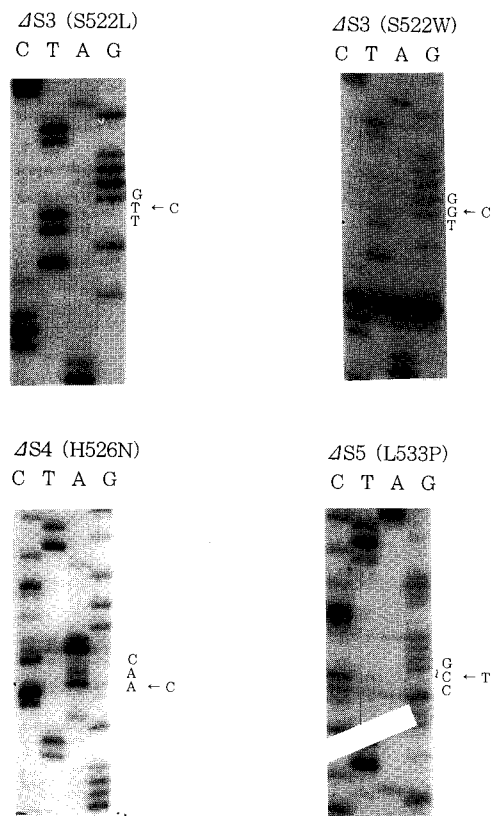


Fig. 2. Mutations identified by direct sequencing of PCR products
Localization is shown of the 4 of 7 point mutations which were not confirmed by LiPA, ΔS3 (S522L), ΔS3 (S522W), ΔS4 (H526N), and ΔS5 (L533P). Arrows indicate the nucleotide substitutions.

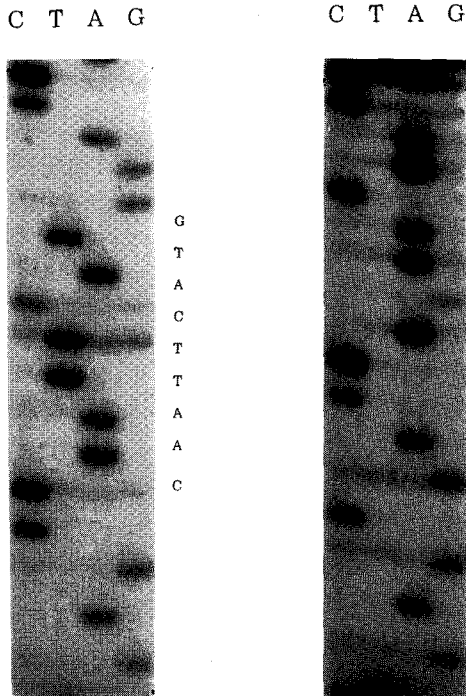


Fig. 3. Deletion mutation identified by direct sequencing of PCR products
 Localization is shown a 9 bp deletion at codon 513~515. Left panels show the wild-type sequences of *rpoB* gene in *M. tuberculosis* and right panels show sequences of mutant *rpoB* gene. Nucleotide sequences at right border of left panel indicate the deleted nucleotides in right panel. Arrow in right panel indicates the location of deletion

있는 것으로 추정되었던 ΔS1, S2가 codon 513에서 515 까지 9염기의 결실이 있었던 때문으로 밝혀졌고 (그림 3), S2지역에 돌연변이가 있는 것으로 추정되었던 ΔS2는 D516Y 돌연변이였으며, ΔS3가 2예에서 S522L, 1예에서 S522W 돌연변이였고, ΔS4가 1예에서 H526N 돌연변이였고 1예에서 H526R 돌연변이였으며 또 다른 1예는 H526C 돌연변이였으며, ΔS5형 2예는 모두 L533P 돌연변이였다. 본 연구에서 알게 된 12종의 돌연변이 가운데 9bp결실과

S522W는 현재까지 알려진 바로는 동일한 위치에서의 돌연변이가 보고된 바가 없는 처음으로 보고되는 유형의 돌연변이이다. 이들 결과를 표 2에 LiPA 결과와 비교하여 요약하였고 그림 4에 도해하였다.

고 찰

결핵균은 이전에 항결핵약제에 노출되지 않더라도 무작위 돌연변이로 약제내성을 가지게 되며 이러한 내성은 적절한 약제의 조합으로 극복을 할 수 있으나 부적절한 치료는 내성 균주의 증가를 초래하게 된다. 항결핵약제 치료의 초기 보고에 의하면 1~3%의 약제내성이 보고되고 있으며 특징적으로 단독약제내성의 경향을 보였다²³⁾.

Fischl 등²⁴⁾의 연구에 의하면 다제내성결핵 환자 62예를 대조군(단일 약제내성 또는 감수성결핵) 55예와 비교하여 조사한 결과 현재의 진단과 치료법이 부적절하여 다제내성균의 증가를 억제치 못하고 있으므로 새로운 조기 진단 및 적절한 치료법의 개발이 절실히 요구된다고 하였다. 최근 분자 생물학의 발달로 약제감수성균과 내성균에 있어서 유전물질의 구조 차이를 이용하여 감별하는 여러 가지 방법 등이 보고되고 있다.

RMP은 INH와 함께 결핵치료의 근간을 이루는 약제로서, Telenti 등²¹⁾은 *Mycobacterium tuberculosis*에서 *rpoB* 유전자를 cloning하고 염기서열 결정을 실시한 후 염기서열을 비교하였다. 그 결과 RMP 내성 66예의 결핵균중 64예에서 15종의 돌연변이가 발견되었고, 내성에 관계된 점돌연변이가 23개의 아미노산(codon 511~533)을 coding하는 69염기쌍 지역에 모두 모여 있었으며 531번째 아미노산인 serine이 leucine, glutamine과 tryptophan등으로 치환된 것이 가장 많은 것으로 나타났다. 또한 codon 516의 GAC → TAC (His → Tyr) 및 codon 531의 TCG → TTG (Ser → Leu)의 두 종류의 점돌연변이가 61%의 높은 빈도를 보였다. 이들은 계속된 연구에서 Orita 등²⁵⁾이 개발한 PCR-

Table 2. Sequence analysis of 32 rifampin-resistant *M. tuberculosis* strains

Mutation Type ^a	LiPA profile	Nucleotide substitution	Amino acid substitution	Frequency of substitution ^b
D516Y	ΔS2	GAC → TAC	Asp → Tyr	1(3.1%)
D516V	R2	GAC → GTC	Asp → Val	1(3.1%)
S522L	ΔS3	TCG → TTG	Ser → Leu	2(6.3%)
S522W ^c	ΔS3	TCG → TGG	Ser → Trp	1(3.1%)
H526Y	R4a	CAC → TAC	His → Tyr	3(9.4%)
H526D	R4b	CAC → GAC	His → Asp	1(3.1%)
H526N	ΔS4	CAC → AAC	His → Asn	1(3.1%)
H526R	ΔS4	CAC → CGC	His → Arg	1(3.1%)
H526C	ΔS4	CAC → TGC	His → Cys	1(3.1%)
S531L	R5	TCG → TTG	Ser → Leu	17(53.1%)
L533P	ΔS5	CTG → CCG	Leu → Pro	2(6.3%)
deletion ^c	ΔS1, S2	CAATTCATG	Gln-Phe-Met	1(3.1%)

^aThe numbers correspond to *E. coli* RNA polymerase codon alignment

^bNumbers of isolates and percent among total 32 rifampin-resistant strains

^cTwo new mutations identified for the first time in this experiment.

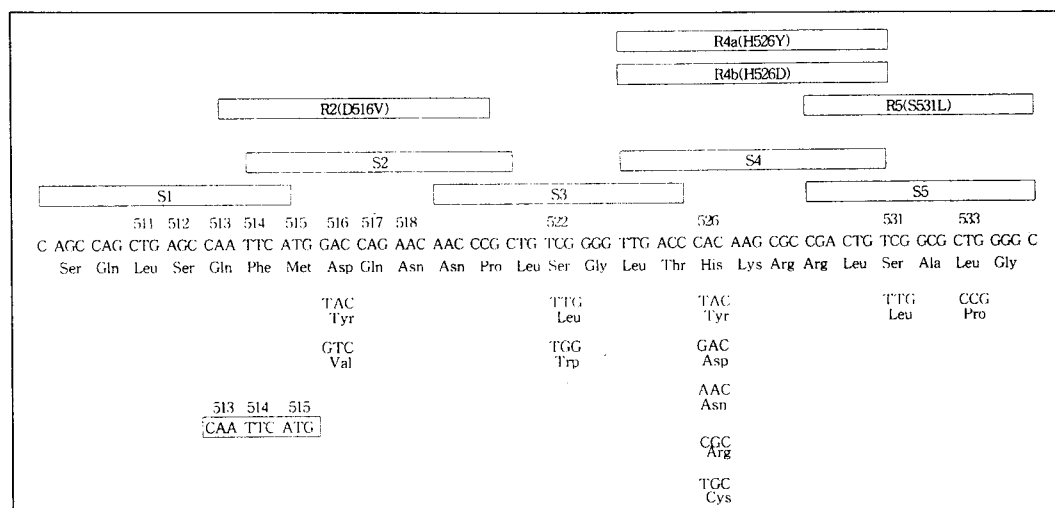


Fig. 4. Wild-type nucleotide and amino acid sequence of the relevant part of the *rpoB* gene

The numbering system is based on the *E. coli* RNA polymerase alignment.

The numbers above the wild-type sequences indicate the mutation sites yet reported. The nucleotide and amino acid sequences below the wild-type sequence indicate mutations detected in this experiment. The horizontal bar below the wild-type nucleotide sequence indicate 9bp deletion site from codon 513 to 515.

SSCP(singlestrand conformation polymorphism)법을 이용하여 자동화된 방법으로 간단히 유전자의 구조변화를 조사함으로써 약제 내성 유전자를 검출할 수 있었다.

RMP 내성에 관련된 유전자인 *rpoB*를 보다 쉽고 빠르게 검출하는 새로운 방법으로서 Beenhouwer 등²²⁾은 PCR로 *rpoB* 유전자를 증폭시킨 후 이를 역교잡법(reverse hybridization)²⁶⁾을 이용한 새로운 방법으로 분석(Line Probe Assay, LiPA)을 시행하여 내성 결과를 신속하고 정확하게 판정할 수 있었음을 보고하였다. 본 실험에서 총 42예의 검체로 LiPA를 시행한 결과 RMP 감수성 균주 10예 전예에서 S 락이 모두 발색을 나타내어 돌연변이가 없는 wild-type의 *rpoB* 유전자임을 알 수 있었다. RMP 내성 균주 32예는 모두 S 락중 하나 이상이 발색을 나타내지 않아 돌연변이를 가지는 것으로 나타났다. 이 중 22예(68.8%)에서는 빈도가 높은 돌연변이 4가지 (R 2 ; D516Y, R4a ; H526Y, R4b ; H526D, R5 ; S 531L)를 바로 검출할 수 있게 제작된 R 락의 발색이 동반되어 약제내성 여부와 함께 정확한 돌연변이 유형을 알 수 있었으나, 10예(31.2%)에서는 S 락의 결실은 있었으나 앞에서 언급한 R 락의 지역 외의 돌연변이로 정확한 돌연변이 유형을 LiPA 방법으로는 알 수 없었다.

돌연변이의 유형을 알 수 있었던 22예중 17예(77.3%)는 R5(S531L)형이었고, R4a형이 3예(13.6%)로 두 유형이 가장 높은 빈도를 보였다. 다음으로 직접염기서열 결정을 실시하여 정확한 돌연변이의 유형을 알아내고 LiPA의 정확성을 검증해 보았다. 그 결과 모두 11종의 점돌연변이와 1종의 9bp 결실이 관찰되어 합해서 12종의 *rpoB* 유전자 돌연변이가 결핵균의 RMP 내성 획득에 관여하는 것으로 밝혀졌으며 LiPA의 내성결과와 일치함을 알 수 있었다(표 2).

Beenhouwer 등²²⁾은 67예의 임상검체에서 65예(97%)의 LiPA 결과가 RMP 약제 내성 결과와 일치

함을 보고하였고, R 락의 발색이 나타나지 않은 4예의 직접염기서열 분석을 한 결과 H526C 2예, H526 R 1예, L533P 1예의 염기서열을 밝혔으며, 본 실험 결과와 일치하는 돌연변이임을 알 수 있었다. 또한 제일 높은 빈도의 돌연변이는 S531L, H526Y 순이었으며 본 실험에서도 내성균주 32예중 총 20예가 이 형태에 해당하는 결과를 보였다. 임상 검체에서 PCR과 LiPA를 병행할 경우 2일이내에, 배양된 검체를 사용할 경우 8시간내 약제내성 결과를 알 수 있으며 이는 현재까지 보고된 방법중 제일 신속하고 정확한 방법중의 하나라 할 수 있겠다.

현재까지 보고된 *M. tuberculosis*의 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상을 보면 Telenti 등²⁸⁾은 codon 511, 513, 516, 518, 522, 526, 531 및 533에서 14예의 점돌연변이와 1예의 결실을 보고하였다. 이후 보고된 돌연변이 양상을 종합하면^{20, 21, 27~9)} 현재까지 보고된 돌연변이는 점돌연변이가 25종류였으며, 결실에는 8예였고, 삽입에는 1예였으며, 본 실험에서 S 522W의 1예와 codon 513에서 515의 9bp의 결실을 새로 발견하였다. 또한 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상은 각 검체가 수집된 지역의 의미있는 차이는 없었으며, 75%이상의 돌연변이가 codon 526과 531에 몰려있었고, 검사 결과 97%이상에서 RMP 내성의 주 기전은 *rpoB*의 돌연변이임을 확인할 수 있었다.

RMP 내성은 대개 INH의 내성과 동반되어 있으며, 주요 돌연변이를 일으키는 지역이 *rpoB* 유전자의 한정된 지역에 돌연변이가 몰려있는 점에서 이 지역의 돌연변이 검출은 다제내성균의 대표적인 표지자로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 한국인의 결핵균에서 RMP 내성은 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의한 RNA polymerase의 구조변화에 기인하는 것이 주 기전임을 알 수 있었고 직접염기서열 결정법으로 그 양상을 확인하였으며 LiPA법이 약제내성의 조기진단에 유용하게 이용될 수 있는 것으로 판단되었다.

요 약

연구배경 :

다제내성결핵의 증가는 효과적인 결핵 치료를 어렵게 할 뿐만 아니라 결핵관리 사업에 큰 장애로 대두되고 있다. 따라서 다제내성결핵균의 내성획득 기전에 대한 이해와 조기진단 방법의 개발이 시급한 실정이다.

최근 분자생물학의 발달로 결핵균의 유전학적인 검출방법은 기존 배양검사의 감수성에 필적하는 수준이며, 더 나아가 1차 약제인 INH와 RMP 등의 핵산 수준에서 내성기전에 대한 최근의 연구 결과는 더욱 새롭고 빠른 감수성 검사의 기틀을 마련할 것으로 생각된다. RMP에 대한 *M. tuberculosis*의 주 내성기전은 RNA polymerase β subunit (*rpoB*)의 돌연변이로 보고되고 있다.

방 법 :

본 실험에서 42예의 결핵균 배양검체 (RMP 내성 32예, 감수성 10예)를 선택하여 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 분석하였다. 역교잡법 (reverse hybridization)을 이용한 상용화된 INNO-LiPA Line Probe Assay (LiPA)를 이용하여 돌연변이 양상을 검사하고 직접염기서열 방법으로 분석한 결과와 비교하였다.

결 과 :

LiPA에서 RMP 감수성균주는 S띠의 발색이 모두 나타났으며, 내성균주는 모두 R띠의 발색이나 S띠의 소실이 나타나 내성임을 확인할 수 있었다. 내성균주 32예중 22예(68.8%)는 4개의 R띠중 하나의 소실이 있어 바로 돌연변이 양상을 확인할 수 있었으며 R5 (S531L)형이 17예(77.3%)로 제일 많았다. LiPA에서 확인되지 않았던 10예는 직접염기서열 분석법으로 내성양상을 검사한 바, 총 11예의 점돌연변이와 1예의 염기결실을 확인하였다. 이중 S522W와 9 염기쌍의 결실은 현재까지 보고된 바 없는 처음으로 보고되는 유형의 돌연변이였다.

결 론 :

한국인의 결핵균에서 RMP 내성의 주 기전은 *rpoB*

유전자의 돌연변이에 의한 RNA polymerase의 구조 변화에 기인하는 것을 알 수 있었고 직접염기서열 결정법으로 그 양상을 확인하였으며, LiPA법이 RMP 내성의 조기진단에 유용하게 이용될 수 있는 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Sudre P, ten Dam G, Kochi A : Tuberculosis ; A global overview of the situation today. Bull WHO 70 : 149, 1992
2. 보건복지부.대한결핵협회 : 제7차 전국결핵실태조사 결과, 1995
3. Goble M, Iseman MD, Madsen LA, Watte D, Ackerson L, Horsburgh CR : Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. N Engl J Med 328 : 527, 1993
4. Centers for Disease Control : National action plan to combat multidrug-resistant tuberculosis. MMWR 41 : 5, 1992
5. Brudney D, Dobkin J : Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. Am Rev Respir Dis 144 : 745, 1991
6. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW : The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York city. N Engl J Med 328 : 521, 1993
7. Edlin BR, Tokars JL, Grieco MH, Grawford JT, Williams J, Sordillo EM, Ong KR, Kilburn JO, Dooley SW, Castro KG, Jarvis WR, Holmberg SD : An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 326 : 1514, 1992
8. Centers for Disease Control : Outbreak of

- multidrug-resistant tuberculosis-Texas, California, and Pennsylvania. *MMWR* **39** : 369, 1990
9. The American lung association conference on re-establishing control of tuberculosis in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* **154** : 251, 1996
 10. Kent BD, Kubica GP : Public health mycobacteriology ; a guide for the level III laboratory. US department of health and human services. Atlanta : Centers for Disease Control 207, 1985
 11. Vall-Spinosa A, Lester W, Moulding T : Rifampin in the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. *N Engl J Med* **283** : 616, 1970
 12. Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council : Five-year follow-up of a controlled trial of five 6-month regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* **136** : 1339, 1987
 13. Mitchison DA, Nunn AJ : Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* **133** : 423, 1986
 14. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358** : 591, 1992
 15. Banerjee A, Dubnau E, Qyenard A : *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263** : 227, 1994
 16. Horore N, Cole ST : Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **38** : 783, 1994
 17. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C : Cloning and nucleotide sequence of the *Mycobacterium tuberculosis gyr A* and *gyr B* genes and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **38** : 773, 1994
 18. Martin C, Ranes M, Gicquel B : Plasmids, antibiotic resistance, and mobile genetic elements in mycobacteria, *In* Macfadden J (Ed.) *Molecular biology of the Mycobacteria*. p121, Guildford, Surrey University Press, 1990
 19. Jin DJ, Gross CA : Mapping and sequencing of mutations of in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance *J Mol Biol* **202** : 45, 1988
 20. Honore N, Cole ST : Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother* **37** : 414, 1993
 21. Telenti A, Lowrie D, Matter L, Imboden P, Cole S : Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341** : 617, 1993
 22. Beenhouwer HD, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinchx L, Rossau R, Traore H, Portaels R : Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tubercle Lung Dis* **76** : 425, 1995
 23. Hobby GL, Johnson PM, Boytar-Papirnyik V : Primary drug resistance : a continuing study of drug resistance in tuberculosis in a veteran population within the United States. *Am Rev Respir Dis* **110** : 95, 1974
 24. Fischl MA, Daikos GL, Uttamchandani RB : Clinical presentation and outcome of patients with HIV infection and tuberculosis caused by multidrug-resistant bacilli. *Ann Int Med* **117** : 184, 1992
 25. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand con-

- formation polymorphism. Proc Natl Acad Sci USA **86**:2766, 1989
26. Saiki R, Walsh P, Levenson C, Erlich H : Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci USA **86**:6230, 1989
27. Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs WR, Embden JD, Grosset JH, Cole ST : Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis : a molecular study. Lancet **344**:293, 1994
28. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T : Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Antimicrob Agents Chemother **31**:2054, 1993
29. Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, Musser JM : Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York city and Texas. J Clin Microb **32**:1095, 1994