

***RpoB* 유전자 PCR-SSCP법에 의한 임상검체내 Rifampicin 내성 결핵균의 신속진단**

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실, 서울대학교 의과대학 내과학교실*

심태선, 김영환*, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김동순, 김원동

= Abstract =

Rapid Detection of Rifampicin Resistant *M. tuberculosis* by PCR-SSCP of *rpoB* Gene in Clinical Specimens

Tae Sun Shim, M.D., Young Whan Kim, M.D.,* Chae-Man Lim, M.D., Sang Do Lee, M.D.,
Younsuck Koh M.D., Woo Sung Kim, M.D., Dong Soon Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Asan Medical Center,

Asan Institute for Life Science, College of Medicine, University of Ulsan

*Department of Internal Medicine, Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Rifampicin(RFP) is a key component of the antituberculous short-course chemotherapy and the RFP resistance is a marker of multi-drug resistant(MDR) tuberculosis. *RpoB* gene encodes the β -subunit of RNA polymerase of *M. tuberculosis* which is the target of RFP. And *rpoB* gene mutations are the cause of RFP resistance of *M. tuberculosis*. Although several reports showed that PCR-SSCP would be a rapid diagnostic method for identifying the RFP resistance, there were few reports performed using direct, clinical specimens. So we performed PCR-SSCP analysis of *rpoB* gene of *M. tuberculosis* in direct, clinical specimens.

Methods : 75 clinical specimens were collected from patients at Asan Medical Center from June to August 1996. After PCR of IS 6110 fragments, 43 both AFB smear-positive and IS6110 fragment PCR-positive specimens were evaluated. The RFP susceptibility test was referred to the referral laboratory of the Korean Tuberculosis Institute. DNA was extracted by bead beater method. And heminested PCR was done using 0.1ul (1uCi) [α -³²P]-dCTP. SSCP analysis was done using non-denaturing MDE gel electrophoresis.

Results : The results of PCR of IS6110 fragments of *M. tuberculosis* were positive in 55(73%) cases of 75 AFB smear-positive clinical specimens. Of the 55 specimens, RFP susceptibility was confirmed in only 43 specimens. Of the 43 AFB smear-positive and IS6110 fragment-positive specimens, 29 were RFP susceptible and

14 were RFP resistant. All the RFP susceptible 29 strains showed the same mobility compared with that of RFP sensitive H37Rv in SSCP analysis of *ropB* gene. And all the other RFP resistant 13 strains showed the different mobility. In other words they showed 100% identical results between PCR-SSCP analysis and traditional susceptibility test.

Conclusion : The PCR-SSCP analysis of *ropB* gene in direct clinical specimens could be used as a rapid diagnostic method for detecting RFP resistant *M. tuberculosis*.

Key words : *ropB*, multidrug resistance, SSCP, Mycobacterium, tuberculosis, Rifampicin, heminested PCR

서 론

한국에서의 단순홍부방사선 소견상 활동성폐결핵의 유병율은 1965년에 5.1% 였으나 국가결핵관리사업과 단기요법의 도입으로 꾸준히 감소되어 왔지만 1995년의 전국 실태조사에서 전체 인구의 1.0%가 결핵환자로 국민건강에 큰 문제가 되고 있으며 전국에는 아직도 약 40만명이상의 결핵환자가 있을 것으로 추정되고 있다¹⁾. 최근 세계적으로 후천성면역결핍증후군(AIDS)의 증가와 함께 다제약제내성결핵의 증가가 항결핵치료에 중요한 문제점으로 제기되고 있다. 아직 국내에서 AIDS의 유병율은 높지 않지만 AIDS와 무관하게 Isoniazid(INH)에 대한 내성율이 9.2%(1995년), INH와 Rifampicin(RFP)에 대한 동시내성율이 5.3%(1995년)로 높은 내성율을 보여주고 있다¹⁾. 또한 국내에서도 AIDS 환자가 점점 증가추세에 있으므로 결핵의 유병률 및 내성율이 현재보다 증가할 가능성은 충분하다고 하겠다. 따라서 결핵약제내성의 신속한 진단이 필수적이며, 특히 결핵단기치료의 근간이 되는 약제로서 다제약제내성의 지표로 삼는 RFP에 대한 내성을 신속하게 진단하는 일은 필수적이다.

최근 분자생물학의 발전으로 일부 항결핵약제의 내성획득기전이 분자생물학적 수준에서 밝혀지고 있다. 즉, INH 내성획득에는 *katG*²⁾, *inhA*³⁾, 그리고 *ahpC*^{4~5)} 등의 유전자 돌연변이가 관여하고, RFP 내성획득은 *ropB*⁶⁾ 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 밝혀졌다. 또한 streptomycin (SM)내성에는 *rspL*

유전자와 *rrs* 유전자^{7~8)}, fluoroquinolone의 내성에는 *gyrA*, *gyrB*, 그리고 *lfrA* 유전자^{9), 28~29)}, pyrazinamide 내성에는 *pncA*³⁰⁾ 유전자, 그리고 ethambutol 내성에는 *embCAB* gene cluster³¹⁾의 돌연변이가 관여됨이 보고되고 있다. 이중 *ropB* 유전자는 RNA polymerase의 β -subunit을 encoding하는 유전자이다. 이 유전자의 아주 제한된 69 bp (혹은 81 bp) 범위의 돌연변이, 특히 점돌연변이가^{6, 10~11)} RFP내성의 원인임이 밝혀졌고, PCR-SSCP(single strand conformational polymorphism)^{60, 13~17)}, Line probe assay¹²⁾ (solid phase hybridization), Heteroduplex formation¹⁸⁾, Dideoxy fingerprinting¹⁹⁾, 그리고 automatic DNA sequencing²⁰⁾ 등의 여러가지 방법을 이용하여 RFP 내성을 빠르게 진단할 수 있다는 많은 보고가 있었다. 그러나 대부분의 연구는 배양된 균주를 대상으로 하였으며 실제 임상에서 좀 더 유용하게 적용하기 위해서는 직접 환자에서 얻은 임상검체를 대상으로 하여야 하는데 이에 대한 보고는 거의 없었다. 따라서 본 연구자는 객담을 포함한 임상검체를 직접 대상으로 하여 *ropB* 유전자의 PCR-SSCP법이 RFP내성을 조기에 진단할 수 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1996년 6월부터 1996년 8월 사이에 아산재단 서울

중앙병원에서 항산균 도말검사상 양성으로 나온 임상 검체를 직접 대상으로 하였다. 배양된 검체는 Gen-Probe(San Diego, CA, USA)를 이용하여 *M. tuberculosis* complex임을 확인한 후에 대한결핵협회에 감수성검사를 의뢰하였다. 모든 항결핵약제에 감수성인 H37Rv 표준균주를 기준으로 비교하였다.

2. 검체의 처리

50ml 시험관에 10ml의 객담검체와 10ml의 NALC (N-acetyl-L-cysteine)-NaOH용액을 담아서 20초간 vortex mixer로 혼합하고 15분간 실온에 방치하였다. 멸균증류수를 원심분리관 입구 1cm 밑까지 채운 뒤에 3,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 침전물에 0.5ml의 멸균증류수를 넣고 vortex mixer로 혼합한 후 DNA추출에 사용하였다. 기관지폐포세척액과 같이 부유액으로 되어 있는 검체는 바로 DNA추출에 사용하였다.

3. 결핵균 DNA의 추출

Hurley²¹⁾ 등의 방법을 약간 수정하여 1.5ml microcentrifuge tube에 결핵균 검체 200ul를 넣은 후, 0.1mm Zirconium Bead 200ul, TEN용액 100ul, phenol/chloroform/alcohol 용액 200ul를 혼합한 후 mini-Bead beater에서 3분간 처리하여 세포를 파괴함과 동시에 단백질을 변형시켰다. 검체를 3,000rpm으로 5분간 원심분리한 후, 상청액 200ul를 다른 microcentrifuge tube에 옮기고 chloroform/isoamyl alcohol 용액 200ul를 넣고, 3,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상청액을 다른 microcentrifuge tube에 옮겼다. 상청액 100ul을 취하여 3M sodium acetate 10ul와 100% 냉동 ethanol 220ul를 넣고, -70℃ 냉동고에 15분 방치한 후 10,000rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 진공흡인을 이용하여 상청액을 제거하고, 공기중에서 완전히 건조시켰다. 추출된 DNA는 멸균 3차 증류수

100ul에 용해시켜서 -20℃에 보관하였다.

4. 중합효소연쇄반응

먼저 IS6110분절에 대한 중합효소연쇄반응 (PCR)을 시행하였다. IS6110분절에 대한 PCR조건은 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 95℃ 30초, 68℃ 30초, 72℃ 45초씩 35 cycle을 시행한 다음 72℃에서 5분간 반응을 시킨뒤 종료하였다. IS6110분절에 대한 중합효소연쇄반응에서 양성으로 판명된 검체만을 대상으로 *rpoB*유전자의 hemine-sted PCR을 시행하였다.

첫번째는 primer *rpo105*와 *rpo293*을 이용하여 215bp의 분절을 증폭하였다. 10pmole/ul primer *rpo105*, *rpo293*를 각각 1ul씩 넣고 DNA 1ul을 넣은 후 17ml의 증류수를 넣어서 최종 20ul이 되게 하였다. 반응조건은 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 72℃에서 1분, 95℃에서 30초씩 35 cycle을 시행한 다음 72℃에서 5분간 반응을 시킨뒤 종료하였다. 첫번째 PCR 산물을 1 : 100 내지 1 : 1000배 희석하여 primer *rpo105*와 *rpo273*을 이용한 heminested PCR의 기질로 사용하였다. 10 pmole/ul primer *rpo105*, *rpo273* 각각 1ul씩, 희석된 PCR산물 1ul, [α -³²p]-dCTP 0.1ul(1uCi), 그리고 16.9ul의 3차 증류수를 넣어 20ul이 되게 하였다. 반응조건은 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 74℃에서 1분, 95℃에서 30초씩 50cycle을 시행한 다음 72℃에서 5분간 반응을 시킨후 종료하였다. 중합효소연쇄반응에는 GeneAmp PCR System 9600(Perkin ELMER, Norwalk, CT, USA)을 사용하였으며 반응액은 20ul용 PCR Pre-Mix Kit (Korea Biotech. Inc., Taejeon, Korea)을 이용하였다.

5. PCR-SSCP(single strand conformational polymorphism)

0.75배의 MDE gel용액과 0.6배의 TBE buffer를

함유하는 75ml에 TEMED 30ul와 10% ammonium persulfate 300ul을 섞어 gel을 만들었다. 동위 원소가 들어있는 중합효소 연쇄반응 산물중 1ul를 취하여 SSCP loading용액 2ul와 섞어 95℃에서 5분간 가열 시킨뒤 즉시 얼음에 넣어서 5분간 보관한 뒤에 3ul를 loading하고 6Watt에서 12시간동안 실온에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 유리판을 분리하여 gel을 3M paper에 붙여서 wrap으로 싸운뒤 80℃에서 2시간동안 gel을 건조시킨 후 X-ray film을 cassette에 넣고 -70℃에서 12시간 동안 autoradiography를 시행하였다.

6. Primers

사용한 primer는 다음과 같으며 primer는 Korea Biotech. Inc에 의뢰하여 제조하였다. rpo105 : 5'-CGT GGA GAT CAC ACC GCA GAC GT-3' (26mer)

rpo273 : 5'-GAC CTC CAG CCC GGC ACG ACG T-3'(25mer)

rpo293 : 5'-AGT GCG ACG GGT GCA CGT CGC GGA CCT-3'(27mer)

IS6110-S : 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-3'(20mer)

IS6110AS : 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3'(20mer)

결 과

1. 검체

총 75검체를 대상으로 하였다. 이중 객담 70예, 기관지세척액 2예, 늑막액 2예, 그리고 고환의 hydrocele 흡인액이 1예이었다. 이중에서 IS6110분절 PCR양성인 검체는 객담 52예(74%), 기관지세척액 1예(50%), 늑막액 2예(100%), 그리고 hydrocele이 0예(0%)로 합하여 총 55예(73%)이었다(Table 1). 검체의 채취부위와 상관없이 항산성 도말결과와 IS6110분절 PCR결과를 비교하면 항산성 도말결과가 trace로 나온 25예중 16예(64%), 1+ 14예중 9예(64%), 2+ 16예중 14예(88%), 3+ 6예중 5예(83%), 4+ 14예중 11예(79%)에서 IS6110분절 PCR결과가 양성이었다(Table 2).

IS6110분절 PCR결과가 양성으로 나온 55예중 배양이 되지 않거나 배양중 다른 세균에 의해서 오염이 되었거나 혹은 배양후 감수성검사에 오염이 되어 RFP에 대한 감수성 결과를 확인할 수 없었던 12예를 제외한 43예에서 *rpoB* 유전자의 PCR-SSCP 분석을 시행하였다.

2. PCR-SSCP 분석

총 43예중 29예는 표준균주인 H37Rv와 동일한 전

Table 1. Results of PCR of IS6110 fragments in 75 clinical specimens

Specimens PCR	Sputum	Bronchial washing	Pleural fluid	Hydrocele*	Total
IS6110 PCR(+)	52	1	2	0	55(73%)
IS6110 PCR(-)	18	1	0	1	20(27%)
	70	2	2	1	75(100%)

* Hydrocele of testis

Table 2. Results of PCR of IS6110 fragments according to the result of AFB smear in 75 clinical specimens

AFB smear \ PCR	Trace	1+	2+	3+	4+	Total
IS6110 PCR(+)	16(64%)	9(64%)	14(88%)	5(83%)	11(79%)	55(73%)
IS6110 PCR(-)	9(36%)	5(36%)	2(12%)	1(17%)	3(21%)	20(27%)
	25	14	16	6	14	75(100%)

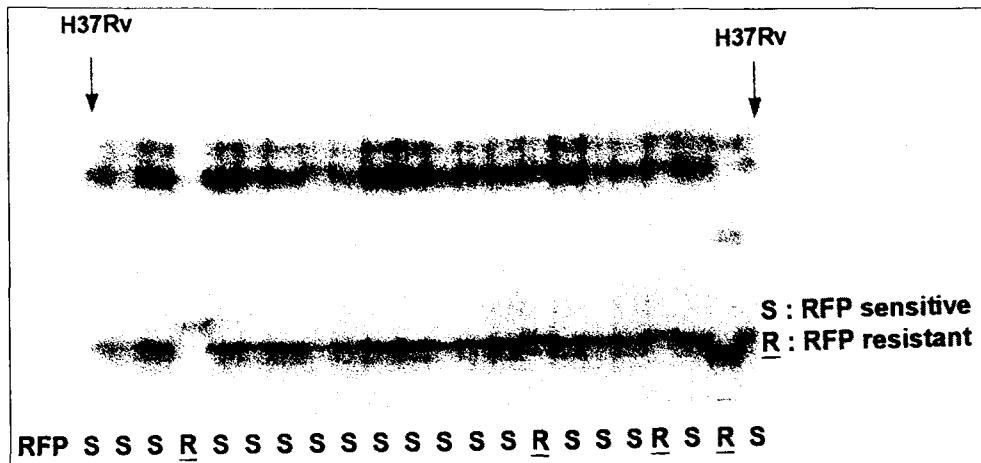


Fig. 1. Analysis of *rpoB* gene of *M. tuberculosis* in direct clinical specimens.

The arrows show the reference strain H37Rv. The isolates with different mobility compared with that of H37Rv turned out to be RFP resistant by traditional RFP susceptibility test.

기영동상의 이동성을 보였고, 14에는 다른 이동성을 보여주었다(Fig. 1). 동일한 이동성을 보인 29에 모두 감수성검사상 REP감수성으로 판명되었고, 다른 이동성을 보인 14에 모두 REP내성으로 판명되었다. (Table 3). 즉 기존의 전통적인 RFP감수성검사 결과와 *rpoB*유전자를 이용한 PCR-SSCP분석은 100% 일치하는 결과를 보여주었다.

고 찰

Rifampicin(RFP)은 1963년에 *Streptomyces mediterranei*에서 처음 발견된 항생제로서 1965년부터 항결핵약제로서 치료에 이용되어 왔다. 이후로 단

기요법이 가능하게 되었고 우리나라에서는 국가적인 결핵퇴치사업과 생활수준의 향상으로 결핵의 유병율은 계속 감소추세에 있다. 그러나 1980년대 후반부터 서구에서는 AIDS의 증가와 함께 결핵의 유병율이 다시 급속하게 증가하였고 다제약제내성균주의 증가가 큰 문제로 대두되었다. 특히 우리나라에서는 Isoniazid(INH)에 대한 내성이 9.2%(1995년), RFP에 대한 내성이 5.3%(1995년)에 이를 정도로 AIDS와 관련없이 과거부터 높은 약제내성율을 보여왔으며, 최근 국내에서도 AIDS가 증가추세에 있으므로 약제내성결핵균이 더욱 증가할 가능성이 있다. 특히 RFP에 대한 내성은 다제약제내성의 지표가 될만큼 중요한 역할을 차지하고 있는데 국내의 RFP에 대한 내성을

Table 3. PCR-SSCP results of *M. tuberculosis* in clinical specimens according to the RFP susceptibility.

PCR	Sensitivity	
	RFP Sensitive	RFP Resistant
SSCP(-)	29	0
SSCP(+)	0	14
	29	14

SSCP(-) : the result of same mobility compared with that of RFP sensitive H37Rv in PCR-SSCP of *rpoB* gene of *M. tuberculosis*.

SSCP(+) : the result of different mobility compared with that of RFP sensitive H37Rv in PCR-SSCP of *rpoB* gene of *M. tuberculosis*.

이 5.3%인데 비하여 INH와 RFP에 대한 동시내성이 5.3%임을 감안하면 RFP내성균주는 대부분 INH에도 내성임을 알 수 있다¹⁾.

약제내성의 문제점은 대부분의 경우에 난치성결핵의 경과를 거치고 또한 약제내성의 진단에 오랜 시간이 걸리므로 지속적인 감염원이 된다는 점이다. 현재로서는 치료중 또는 치료전에 약제내성이 밝혀지면 치료약제를 바꾸는 소극적인 대처가 유일한 방법이다. 그러나 통계에서 보는 바와 같이 한 가지 약제에 내성이면 다른 약제에도 동시에 내성인 경우가 많고, 현재 임상에서 사용가능한 항결핵약제는 10여종에 불과하나 결핵은 균의 특성상 최소 4~5종의 약제를 동시에 투여하는 다제병용요법이 원칙인 실정을 감안하면 일단 결핵균이 내성을 획득하거나 약제내성균에 감염되면 완치의 가능성은 떨어진다고 할 수 있다. 그러나 전통적인 감수성검사방법은 배양에 4~6주가 걸리고 감수성검사에 2~4주가 걸릴 정도로 오랜 시간을 필요로 한다. 따라서 약제내성을 신속하게 진단하고 극복할 수 있는 적극적인 진단 및 치료법의 개발이 시급히 요청되고 있다. 이를 위해서는 항결핵약제들의 정확한 작용기전과 내성의 기전에 대한 연구가 필수적이다.

과거부터 *Escherichia coli*에서는 RNA polymerase를 encoding하는 유전자의 특정 염기의 치환이 RFP내성과 연관되어 있음이 알려져 왔고²²⁾, 결핵

균에서도 RFP 내성은 RNA polymerase의 변화 때문이라고 생각하였지만 정확한 기전은 모르고 있었다²³⁾. 최근 분자생물학의 발달로 인한 항결핵약제의 내성 획득기전이 분자생물학적 수준에서 조명되면서 RFP 내성 획득은 *rpoB*²⁴⁾ 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 알려졌다. *rpoB* 유전자는 RFP의 작용부위인 RNA polymerase의 β subunit을 encoding하는 유전자로 1993년 Telenti 등에 의하여 결핵균에서 처음 밝혀졌다²⁵⁾. 보고에 의하면 RFP 내성에 관여하는 *rpoB* 유전자의 돌연변이는 대부분 점돌연변이이며 이 돌연변이들은 아주 제한된 69bp범위에서 일어나므로, 최근에 점돌연변이를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 PCR-SSCP(single strand conformational polymorphism)법이나 Line probe assay 등을 이용하여 RFP 내성을 간편하고 빠르게 진단하려는 노력이 시도되고 있다. 한편으로는 *rpoB* 유전자의 69bp부위의 돌연변이중 드물게 silent mutation에 대한 보고가 있는데, 이런 경우 실제로는 아미노산의 변화가 없으므로 RFP감수성이지만 돌연변이가 있으므로 SSCP 검사에서는 전기영동상 이동성의 차이를 보여 RFP 내성으로 결과가 나오게 되므로 이런 문제점을 극복하기 위해서는 결국 sequencing이 RFP내성 진단을 위한 제일 좋은 방법이라는 보고도 있다²⁷⁾.

이중 SSCP는 non-denaturing polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 시행하는 방법으로

서 같은 크기의 DNA 분절이라도 염기서열의 차이에 따라 이동성의 차이를 나타낸다. 그러므로 점돌연변이로 1개의 염기만 바뀌어도 DNA의 구조적변화를 일으켜서 돌연변이를 일으키지 않은 같은 크기의 DNA 분절과 이동성의 차이를 보여 점돌연변이 여부를 쉽게 구별할 수 있다. 전기영동에서 적절하게 밴드(band)가 구분되기 위해서는 gel의 상태와 성분 그리고 전기영동의 조건등이 중요하므로 본 연구에서는 MDE gel(Hydrolink, AT biochem Inc., Malvern, Pa.)을 사용하여 동일한 gel 성분과 동일한 조건에서 전기영동을 시행하였다.

SSCP법을 이용한 외국의 연구결과를 보면 RFP 내성 66예중 64예, 8예중, 8예, 13예중 13예, 29예중 28예에서 SSCP법으로 RFP내성을 발견해서 SSCP가 아주 예민한 검사임을 보여주고 있다^{6, 13-15}. 본 연구자도 RFP에 감수성인 27 배양균주와 RFP에 내성인 25 배양균주에서 *rpoB* 유전자의 PCR-SSCP를 시행하여 RFP에 감수성인 27균주 모두 H37Rv와 동일한 밴드(band)의 양상을 보여주었고 RFP에 내성인 25균주 모두에서 H37Rv와 다른 밴드(band)의 양상을 보여주어 두 검사간에 100% 일치하는 결과를 발표하였다²⁴. 또한 국내의 다른 보고에서 이등이²⁵ RFP내성 12예중 11예에서 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 발견하였다. 그러나 지금까지의 연구들에는 몇가지 제한점이 있다. 첫째, 이들 대부분의 연구들은 배양된 균주들을 대상으로 하였다는 점이다. 실제로 임상에서 빠른 시간내에 적용하기 위해서는 환자에게서 직접 얻은 임상검체를 대상으로 하여야 한다. 둘째, 대부분이 같은 TR-8, TR-9 primer를 사용하였다. 그러나 최근의 보고에 의하면 *rpoB* 유전자는 다른 종의 mycobacterium과 G-C성분이 풍부한 다른 세균들에서도 비특이적으로 증폭되므로 결핵균의 약제내성여부를 보기 위해서는 결핵균에만 특이적인 염기서열을 primer로 사용하여야 한다는 점이다²⁶. 물론 본 연구자도 과거의 발표에서는 TR-8, TR-9 primer를 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다²⁴. 그러나 그 연구에서는 배양된 균주를 대상으로 하였으

며 배양후에 Gen-Probe를 이용하여 결핵균으로 확인된 균주만을 대상으로 하였기 때문에 SSCP결과를 해석하는데 무리가 없었다고 본다. 그러나 객담과 같이 환자에게서 직접 채취한 검체에는 결핵균 외에도 다양한 세균들이 있기 때문에 결핵균 외의 다른 세균의 유전자가 증폭된다면 올바른 결과를 얻지 못하게 될 것이다. 본 연구자도 배양된 검체를 대상으로 TR-8과 TR-9 primer를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였을 때는 157bp 크기의 밴드(band) 하나만 깨끗하게 나왔지만 객담을 대상으로 하였을 때는 다양한 크기의 많은 비특이적인 밴드가 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 결핵균에만 특이적이라고 보고된 부위를 이용하여 만든 primer를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. IS6110분절의 중합효소연쇄반응이 음성임에도 불구하고 TR-8과 TR-9 primer를 이용한 중합효소연쇄반응에서도 많은 비특이적인 밴드가 관찰되었으나, 결핵균에 특이적으로 보고된 primer를 이용한 중합효소연쇄반응에서는 비특이적인 밴드가 없이 IS6110분절을 이용한 결과와 일치하는 결과를 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 객담 등 임상검체를 직접 대상으로 하여 *rpoB* 유전자 PCR-SSCP법의 RFP 내성의 진단적 유용성을 알아보는 것이 주 목적이었으므로 우선적으로 항산균도말 양성인면서 IS6110분절의 PCR에서 양성인 균주만을 대상으로 하였다. 항산성도말 양성인 75예중 55예에서만 IS6110분절 PCR에서 양성으로 나와 다른 연구의 결과보다는 낮은 PCR의 예민도를 보여 주었다. 본 연구에서는 검체를 새로이 환자에게서 채취하지 않고 임상병리과에 항산균도말검사가 의뢰되어 도말경검사 및 배양을 하고 남은 검체를 본 연구에 이용하였으므로 일부의 검체는 아주 미량의 검체밖에 남지 않아서 음성의 결과가 나오지 않았나 생각된다. 그러므로 환자에게서 새로이 검체를 채취하였다면 좀 더 좋은 결과를 보였을 것으로 생각한다.

감수성검사 결과를 모르는 상태에서 PCR-SSCP를 먼저 시행하고 결과를 분석하였는데 일부의 밴드는

표준균주인 H37Rv와 비교하였을 때 아주 미미한 이동성의 차이를 보여서 내성여부를 판별하기 어려웠다. 이전의 배양검체를 대상으로 한 연구에서는 밴드의 이동성이 명확히 구분되어 분석에 어려움이 없었는데²⁴⁾ 이와 비교하면 밴드의 구분이 아주 애매하였다. 그러나 이미 감수성검사 결과가 판명된 약 반수의 검체에서 SSCP 결과를 비교하였는데 아주 미미한 이동성의 차이를 보였던 균주 모두가 RFP에 내성균임이 판명되었다. 따라서 감수성검사 결과가 아직 판명되지 않은 나머지 반수의 검체에서는 이 결과를 기초로 하여 PCR-SSCP 결과를 먼저 분석하였으며 나중에 감수성검사 결과가 나온 후 결과를 서로 비교하였을 때 100% 일치하는 결과를 보여 주었다. 따라서 본 연구의 결과로서 임상검체를 직접 대상으로 한 *rpoB* 유전자의 PCR-SSCP법은 RFP내성을 신속히 진단할 수 있는 아주 유용한 임상적 방법으로 생각된다. 그러나 이미 언급한 바와 같이 밴드의 구분이 아주 용이하지 않았으므로 이를 좀 더 뚜렷히 구분하기 위해서는 새로운 PCR-SSCP의 조건을 찾거나 새로운 primer를 사용하여 밴드의 구분이 좀 더 뚜렷할 수 있도록 노력해야 할 것으로 보인다. 또한 동위원소를 사용하지 않아도 되는 silver staining 등의 새로운 방법을 시도해야 하겠고, SSCP법이 결국 돌연변이를 찾아내는 방법인 만큼 돌연변이를 쉽게 찾아낼 수 있는 다른 여러가지 방법들을 이용하여 각 방법들 중 가장 경제적이고 손쉬운 방법을 찾도록 노력해야 할 것으로 생각된다.

결론적으로, 결핵균의 *rpoB* 유전자 PCR-SSCP를 이용한 RFP내성의 조기진단은 임상적으로 유용한 방법으로 기대된다.

요 약

연구배경 :

결핵균의 *rpoB* 유전자는 Rifampicin이 결합하여 약리작용을 나타내는 RNA polymerase의 β -subunit

을 encoding하는 유전자이다. 최근 PCR-SSCP 등의 다양한 방법을 이용하여 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 발견함으로써 결핵균 다제약제내성의 지표인 Rifampicin 내성을 조기에 진단할 수 있는 방법에 대한 여러 보고가 있다. 그러나 대부분 배양된 검체를 대상으로 하였고 객담등의 임상검체를 직접 대상으로 한 연구는 별로 없었다. 본 연구는 직접 임상검체를 대상으로 결균의 *rpoB* 유전자 PCR-SSCP를 시행함으로써 rifampicin 내성을 신속히 진단할 수 있는지 알아보았다.

대상 및 방법 :

1996년 6월부터 8월까지 아산재단 서울중앙병원에서 항산성도말검사 양성인 75검체를 대상으로 하였다. 이중 결핵균의 IS6110분절을 이용한 중합효소 연쇄반응이 양성이고 RFP 감수성검사 결과가 확인된 43검체를 대상으로 하였다. Bead beater법으로 DNA를 추출하여 heminested PCR을 시행하였고 MDE gel을 이용하여 SSCP를 시행하였다. 이 검체들은 배양 즉시 대한결핵협회에 감수성검사를 의뢰하여 PCR-SSCP 결과와 rifampicin 감수성검사 결과를 비교하였다.

결 과 :

75검체중 55예(73%)에서 IS6110분절에 대한 PCR 양성이었다. 이중에서 RFP에 대한 감수성결과가 확인된 43예를 대상으로 하였다. 29예는 표준균주인 H37Rv와 동일한 전기영동상의 이동성을 보였고, 14예는 다른 이동성을 보여 주었다. 동일한 이동성을 보인 29예 모두 감수성검사상 RFP감수성으로 판명되었고, 다른 이동성을 보인 14예 모두 RFP 내성으로 판명되었다. 즉 기존의 전통적인 RFP 감수성검사 결과와 직접임상검체에서 *rpoB* 유전자를 이용한 PCR-SSCP분석은 100% 일치하였다.

결 론 :

임상검체에서 직접 *rpoB* 유전자의 heminested PCR을 이용한 SSCP법은 Rifampicin내성을 신속히 진단할 수 있는 방법으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부 대한결핵협회 : 제7차 전국 결핵실태 조사결과, 1995
2. Zhang Y, Heym-B, Allen B, Young D, Cole ST : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 358 : 591-3, 1992
3. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um K S, Wilson T, Collins D, del Lisle G & Jacobs W R : *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 263 : 227-30, 1994
4. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, Stover CK. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 272(5268) : 1641-3, 1996
5. Wilson TM, Collins DM. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mol Microbiol*. 19 : 1025-34, 1996
6. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston M J, Matter L, Schopfer K & Bodmer T : Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341 : 647-50, 1993
7. Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob-Agents-Chemother* 37 : 414-8, 1993
8. Nair J, Rouse DA, Bai GH, Morris SL. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol-Microbiol* 10 : 521-7, 1993
9. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, Telenti A. Closing and nucleotide wequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob-Agents-Chemother*. 38 : 773-80, 1994
10. Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick M R, Wanger A, Kreiswirth B N & Musser J M : Charaterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene(*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 32 : 1095-1098, 1994
11. Donnabella V, Martiniuk F, Kinney d, Bacerdo M, Bonk S, Hanna B & Rom W N : Isolation of the gene for the beta subunit of RNA polymerase from rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and indentification of new mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1127 : 639-643, 1994
12. De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinckx L, Rossau R, Traore H, Portaels F. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tubercle & Lung Disease*. 76 : 425-30, 1995
13. Morris S, Bai G H, Suffys, P, Portillo-Gomez L, Fairchok M & Rouse D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 171 : 954-960, 1995
14. Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs-WR Jr, van-Embden JD, Grosset JH, Cole ST. Implica-

- tions of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis : a molecular study. *Lancet*. 344 : 293-8, 1994
15. Donnabella V, Martiniuk F, Kinney D, bacerdo M, Bonk S, Hanna B & Rom W N, Isolation of the gene for the beta subunit of RNA polymerase from rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of new mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1127 : 639-643, 1994
 16. Telenti A, Imboden P, Marchese F, Schmidheini T & Bodmer T : Direct, automated detection of rifampin-resistant tuberculosis by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 37 : 2054-8;, 1993
 17. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, and Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 2766-2770, 1989
 18. Williams DL, Waguspack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 38 : 2380-6, 1994
 19. Felmell TA, Liu Q, Whelen AC, Williams D, Sommer SS, Persing DH. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance : comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting *Journal of Clinical Microbiology*. 33 : 1617-23, 1995
 20. Kapur V, Li LL, Hamrick MR, Plikaytis BB, Shinnick TM, Telenti A, Jacobs WR Jr, Banerjee A, Cole S, Yuen KY, et al. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 119 : 131-8, 1995
 21. Hurley SS, Splitter Ga, Welch RA : Rapid lysis technique for *Mycobacterial* series. *J Clin Microbiol* 25 : 2226, 1987
 22. Jin D and Gross C : Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* 202 : 45-58, 1988
 23. Yamada T, Nagata A, Ono Y, Suzuki Y, Yamanouchi T : Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 27 : 921-24, 1985
 24. 심태선, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 결핵균의 rpoB 유전자 PCR-SSCP법에 의한 Rifampicin 내성의 신속진단. *결핵 및 호흡기질환*. 43 : 842-851, 1996
 25. 이민기, 박승규, 김철민, 송선대, 정병선, 정황규, 반숙규. 다제내성결핵균에서 rifampin 및 isoniazid 내성관련 유전자의 분석. *결핵 및 호흡기질환*. 42(S2) : 35, 1995
 26. Whelen AC, Felmlee TA, Hunt JM, Williams DL, Roberts GD, Stockman L, & Persing DH. Direct genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* 33 : 556-561, 1995
 27. Kim BJ, Kim SY, Park BH, Lyu MA, Park

- IK. Bai GH, Kim SJ, Cha CY, Kook YH. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 35 : 492-4, 1997
28. Kocagoz T, Hackbarth CJ, Unsal I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 40 : 1768-74, 1996
29. Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, Salazar L, Bloom BR, Jacobs WR Jr. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 : 362-6, 1996
30. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacilli. *Nature Med*. 2(6) : 662-667, 1996
31. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR Jr. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Med*. 3 : 567-70, 1997