

Rifampicin 내성 결핵균의 검출에 있어서 PCR-line Probe법과 PCR-SSCP법의 비교†

성균관대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리학과교실*, 울산대학교 의과대학 내과학교실*

김호중, 서지영, 정만표, 김종원*, 심태선*, 최동철, 권오정, 이종현, 한용철

= Abstract =

Comparison of PCR-Line Probe and PCR-SSCP Methods for the Detection of Rifampicin Resistant Mycobacterium Tuberculosis

Hojoong Kim, M.D., Gee Young Suh, M.D., Man Pyo Chung, M.D., Jong Won Kim, M.D.,*
Tae Sun Shim, M.D.†, Dong-Chull Choi, M.D., O Jung Kwon, M.D.,
Chong H Rhee, M.D., and Yong Chol Han, M.D.

Department of Medicine and Department of Clinical Pathology*, Sung Kyun Kwan University
College of Medicine, Suwon, Korea,

Department of Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine†, Ulsan, 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 the mutations of *rpoB* gene have been found in about 96% of rifampicin resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*. So in order to find a rapid and clinically useful diagnostic method in identifying the RFP resistance, we compared the PCR-line probe method with PCR-SSCP for the detection of the *rpoB* gene mutation in cultured *M. tuberculosis*.

Methods : 45 clinical isolates were collected from patients who visited *Sung Kyun Kwan University Hospital*. The RFP susceptibility test was referred to the referral laboratory of the Korean Tuberculosis Institute. 33 were rifampicin resistant and 12 were rifampicin susceptible. The susceptibility results were compared with the results of the PCR-SSCP and PCR-line probe method.

Results : We could find *rpoB* mutations in 27/33(81.8%) RFP-resistant strains by PCR-line probe method, and in 23/33(69.7%) by PCR-SSCP and there was no significant difference between two methods. There was no mutation in rifampicin susceptible strains by both methods.

† 본 연구는 삼성전자 부설 삼성생명과학연구소 연구비(C-95-060)의 보조로 이루어졌음.

Conclusion : PCR-line probe method would be a rapid, sensitive and specific method for the detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 714-722)

Key words : Rifampicin, Drug resistance, Tuberculosis, *rpoB*, Line-probe assay, SSCP

서 론

약제내성 결핵균의 증가는 결핵의 치료에 새로운 위협이 되고 있으며^{1,2)}, 특히 기존의 진단 방법으로는 약제내성의 확인에 최소 2개월이 소요되어 임상사에게 어려움을 주고 있다³⁾. 최근 분자생물학적 기법의 발달로 결핵균의 약제내성에 관여하는 여러 유전자들이 발견되었고, 이를 이용한 빠른 진단법이 기대되고 있다⁴⁻¹⁴⁾. Rifampicin에 대한 약제내성은 RNA polymerase의 β -subunit 을 coding하는 *rpoB* 유전자의 염기서열 1304번 위치에서 1373번 위치까지의 69개의 염기에 집중되어 있는 돌연변이에 의한 것이 대부분이라는 것이 밝혀졌으며⁴⁻⁷⁾, Telenti 등은 PCR-SSCP법 이외의 진단에 매우 효과적이라고 발표하였고⁷⁾, 최근에는 PCR-line probe법을 이용한 진단 kit가 상업적으로 소개되었다⁸⁻¹⁰⁾. 국내에서도 심 등¹⁵⁾, 김 등¹⁶⁾이 PCR-SSCP법을 이용한 진단법을 발표한 바 있고, PCR-line probe 진단 kit의 성적이 발표되었으나¹⁷⁻¹⁹⁾, 아직 두 방법간의 비교 연구는 없는 실정이다.

이에 저자들은 한국인 결핵환자에서 분리된 약제 감수성 및 내성 결핵균을 대상으로, PCR-line probe 법과 PCR-SSCP법을 이용하여 *rpoB* 유전자의 변이를 관찰하고, 이들 진단 방법에 대한 비교를 목적으로 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 대 상

삼성서울병원을 내원한 환자의 객담 검체 중, 결핵균이 배양되고 결핵연구원에 약제감수성검사를 의뢰하

여 rifampicin 내성이 확인된 33예를 대상으로 하였다. 또한 결핵연구원 약제감수성검사 결과 모든 약제에 감수성인 검체 12예를 음성대조군으로 사용하였다. 본 연구는 DNA의 추출 이후, 연구자가 약제내성 여부를 알지 못하는 상태에서 단일맹검적으로 시행되었다.

2. 방 법

1) 검체의 채취와 보관

배양이 육안으로 확인된 결핵균의 집락을 Ogawa 배지 2개에 동시에 2차 배양하였고³⁾, 이중 1개를 결핵연구원에 약제 감수성검사를 의뢰하였다. 약제감수성 검사 결과 rifampicin내성인 균주의 집락을 채취하여 1.5ml microtube에 생리식염수 0.5ml에 부유시키고, 100°C에서 30분간 가열하여 살균한 후 이를 즉시 -70°C에 보관하였다.

2) DNA의 추출

Proteinase K-phenol 법을 이용하여 시행하였다. 즉 냉동시킨 검체를 실온에서 녹인 후 50 mM Tris HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA, 150 mM NaCl 혼합완충액 10ml와 1 mg proteinase K, 50 μ g RNase, 10% SDS 1 ml를 추가한 후, 교반시키면서 37°C에서 18시간 반응시켰다. 집락균이 완전히 용해된 것을 확인하고, 0.5 ml의 용해액을 동량의 phenol과 반응시켜 DNA를 추출하고 24 : 1 Chloroform/Isoamyl alcohol 용액으로 다시 2회 처리한 후, 70% 냉동 Ethanol로 -70°C 에서 DNA를 침전시키고 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 또한 결핵균의 세포벽에 함유되어 있는 탄수화물 성분을 제거하기 위하여 CTAB를 처리하고²⁰⁾, 1회 더 24 : 1 Chloroform/

Isoamyl alcohol 용액으로 처리하였다. 추출한 DNA는 증류수에 용해시켜 사용하였다. 결핵균에서 추출한 DNA의 정량 및 정성분석을 분광광도계를 이용하여 시행하였다. 모든 검체에서 DNA와 단백질의 비를 나타내는 OD260/OD280이 1.8 이상으로 측정되었으며, DNA는 최종농도가 10 µg/ml가 되도록 증류수에 용해하여 사용하였다.

3) PCR line probe 법

벨기에의 Innogenetics사의 line-probe assay kit (INNO-LiPA)를 사용하였다⁶⁾. 추출한 결핵균 DNA 50 µg 과 제공된 2개의 biotinylated primer (5'-GGTCGGCATGTTCGCGGATGG-3', 5'-GC-ACGTCGCGGACCTCCAGC-3') 25 pM을, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.2 mM MgCl₂, 200 mM 각 dNTP, 0.01% gelatin 용액에서, Taq polymerase 1 unit로 증폭시켰다. 반응 온도 및 시간은 초기 용해는 95°C에서 10분간, denaturation은 94°C에서 45초간, annealing은 66°C에서 45초간, extension은 72°C에서 45초간 모두 25회, 그리고 최종 extension은 72°C에서 10분간 시행하였다. 증폭된 DNA 10 µl는 0.4 M NaOH 용액에서 실온에서 5분간 denaturation시킨 후, 1 ml의 hybridization mixture(3×SCC, 20% deionized formamide, 0.5% blocking reagent)와 함께, nitrocellulose strip에 미리 부착된 11개의 probe들에 50°C에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 nitrocellulose strip은 제공된 avidin-peroxidase-peroxide 용액으로 발색시킨 후, 발색 유무를 육안으로 판정하였다.

4) PCR-SSCP 법

결핵균 DNA 50 µg 과 *rpoB* 유전자 양끝의 primer (5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT-3', 5'-TGC-ACGTCGCGGACCTCCA-3') 각 20pM을 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 2mM MgCl₂, 200mM 각 dNTP, 0.1 uCi[α -³²P]dCTP (Amer-

sham Life Science Inc.), 0.01% gelatin 용액에서, Taq polymerase 1 unit로 증폭시켰다. 반응 온도 및 시간은 초기 용해는 95°C에서 10분간, denaturation은 95°C에서 30초간, annealing은 65°C에서 30초간, extension은 72°C에서 45초간 모두 30회, 그리고 최종 extension은 72°C에서 10분간 시행하였다. 증폭된 DNA 2 µl는 4 µl의 gel loading buffer (95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, 20mM EDTA)와 혼합한 후, 95°C에서 10분간 가열하고 2% polyacrylamide gel에 loading하였다. 0.5배의 TBE 완충액(0.45M Tris-borate, 10mM EDTA)에서 실온에서 6 watt의 전류로 8시간 전기영동하였고, 건조후 X-ray film에 24시간 노출시켰다⁷⁾. 현상한 X-ray film은 대조군(H37Rv)의 band와 비교하여 변이 여부를 판정하였다.

5) 통계처리

통계는 Prizm 통계처리 프로그램을 이용하여 Chi square test를 사용하였으며 p<0.05인 경우 의미 있다고 하였다.

결 과

1. 대상 결핵균의 약제내성 (Table 1)

연구대상 33검체 모두 환자의 객담이었으며, 결핵연구원에 의뢰한 결과 33예 모두 *Mycobacterium tuberculosis*로 동정되었고 rifampicin (RFP) 내성이었다. 이중 30예(90.9%)는 isoniazid (INH)에도 동시 내성을 보였으며, 이러한 INH, RFP 동시 내성균 30예중 28예(93.3%)는 3제 이상의 약제에 내성을 보였다.

2. PCR line probe 법 (Table 1,2)

총 33예의 rifampicin 내성결핵균주중, 27예(81.8%)

Table 1. Drug susceptibility, PCR-line probe, and PCR-SSCP results of 33 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.

No.	RFP	INH	EMB	SM	KM	EVM	PTH	CS	PAS	OFLX	PZA	PCR-LP	PCR-SSCP
1	3+	.	3+	+	–
2	4+	4+	4+	4+	+	NA
3	4+	4+	3+	+	–
4	2+	2+	2+	2+	2+	.	+	–
5	2+	2+	.	3+	.	.	2+	.	2+	.	+	+	NA
6	4+	4+	4+	4+	.	.	4+	NA	NA
7	2+	2+	2+	2+	2+	.	NA	NA
8	1+	1+	1+	.	.	.	1+	.	1+	.	.	+	+
9	4+	+	+
10	3+	3+	3+	+	+
11	3+	3+	3+	+	+	+
12	3+	4+	.	4+	.	.	3+	+	+
13	2+	3+	.	3+	+	+
14	4+	3+	4+	+	–
15	3+	3+	3+	+	–	+
16	3+	2+	3+	+	+
17	4+	4+	4+	4+	+	+
18	3+	3+	3+	3+	+	+
19	3+	3+	3+	+	+
20	3+	3+	3+	+	+	+
21	3+	3+	3+	.	.	.	3+	.	3+	.	.	+	+
22	4+	NA	+
23	3+	3+	.	3+	NA	NA
24	3+	3+	3+	3+	3+	+	+	+
25	3+	3+	3+	3+	3+	3+	+	+	+
26	4+	4+	4+	.	.	+	–
27	3+	3+	3+	3+	+	+	+
28	3+	3+	.	3+	+	+	+
29	3+	3+	.	3+	+	+
30	2+	3+	2+	3+	.	.	3+	.	3+	3+	+	+	+
31	2+	3+	2+	3+	.	.	3+	.	3+	3+	+	NA	+
32	3+	3+	3+	.	.	.	+	+	+
33	4+	3+	4+	3+	3+	3+	+	+	+
Total	33	30	23	17	1	0	8	1	8	6	12	27	23

1+~4+ : grade of drug resistance, . : sensitive to drug

NA : not attributable, + : mutation detected, – : mutation not detected

Table 2. Summary of PCR-line probe assay and PCR-SSCP analysis for the detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

Method		RFP Resistant <i>M. tuberculosis</i> (n=33)	RFP Susceptible <i>M. tuberculosis</i> (n=12)
PCR-line probe assay	Mutation(+)	27(81.8%)	0
	Mutation(-)	1(3.0%)	12(100%)
	Unreadable	5(15.2%)	0
PCR-SSCP	Mutation(+)	23(69.7%)	0
	Mutation(-)	5(15.2%)	12(100%)
	Unreadable	5(15.2%)	0

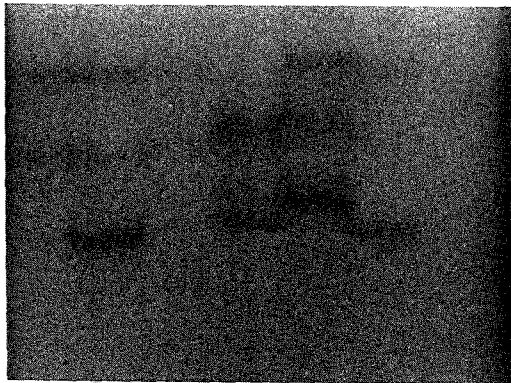


Fig. 1. PCR-SSCP analysis of *rpoB* gene of *M. tuberculosis*.

H37Rv is allsdrug sensitive reference strain. The isolates with different mobility compared with that of H37Rv turned out to be RFP resistant by conventional RFP susceptibility test. RFP-R : rifampicin resistant strain

에서 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 검출되었고, 내성균 1예(3.0%)에서는 돌연변이가 검출되지 않았고, 그리고 결과를 판정할 수 없는 경우가 5예(15.2%)이었다. 감수성 균주 12예 모두 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 검출되지 않았다. Rifampicin 내성결핵균이면서 돌연변이가 검출되지 않았던 경우나 판정이 불가능한 6예의 경우, 다른 예와 비교하여 약제감수성검사 결과

나 추출 DNA의 양의 차이는 없었다.

3. PCR-SSCP법 (Fig. 1, Table 1,2)

총 33예의 rifampicin 내성결핵균주 중, 23예(69.7%)에서 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 검출되었고, rifampicin 내성균주면서 돌연변이를 확인할 수 없었던 경우가 5예(15.2%), 그리고 결과를 판정할 수 없는 경우가 5예(15.2%)이었다. 12예의 약제감수성 균주에서는 모두 *rpoB* 유전자의 돌연변이는 검출되지 않았다. 역시 rifampicin 내성균이면서 돌연변이가 검출되지 않았던 경우나 판정이 불가능했던 10예의 경우, 다른 예와 비교하여 약제감수성검사 결과나 추출 DNA의 양의 차이는 없었다.

4. Rifampicin내성균주에서 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출율의 차이

Rifampicin내성균주에서 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출율의 PCR-line probe법과 PCR-SSCP법간의 차이는 없었다(p=0.25).

고 찰

결핵균의 약제내성 여부 진단의 지연은 약제내성 결핵 환자의 치료에 큰 장애가 되어 왔다. 최근 분자생물학

의 발달에 힘입어 약제내성의 유전자적 기전이 조금씩 밝혀지기 시작하였고, 처음 isoniazid (INH) 내성에 관여하는 *katG* 유전자가 보고되었을 때²¹⁾, 조기진단에 이용할 수 있을 것으로 상당히 기대되었으나, 이 유전자의 돌연변이가 있는 경우가 48-66%에 불과하였고²²⁻²⁵⁾, 돌연변이가 *katG* 유전자의 전체에 골고루 퍼져 있었으며, 그중 많이 발견되는 돌연변이인 codon 463의 돌연변이도 INH 내성과 무관하다는 보고가 있으며²⁶⁾, 또한 *katG* 유전자 이외에도 INH 내성과 관련된 *inhA*²⁷⁾, *ahpC*²⁸⁾이 발견되어 아직까지는 실제 임상에 응용되지 못하고 있다.

반면 rifampicin에 대한 약제내성의 대부분이 RNA polymerase의 β -subunit을 coding하는 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 밝혀지고⁴⁻⁷⁾, 돌연변이가 *rpoB* 유전자의 염기서열 1304번 위치에서 1373번 위치까지의 69개의 염기들 집중되어 있음이 밝혀지면서⁵⁻⁷⁾, 이를 이용한 약제내성 결핵균의 진단에 대한 연구가 활발히 진행되었다. Telenti 등은 유럽 환자에서 분리된 rifampicin 내성 결핵균을 검체로 한 실험에서 17 검체 전 예에서⁴⁾, 그리고 스위스, 프랑스, 영국의 공동 보고에는 46검체중 44예에서⁷⁾ *rpoB* 유전자의 69개의 염기서열 내에서 돌연변이를 확인할 수 있었다.

이와 같이 *rpoB* 유전자의 돌연변이 여부를 확인하므로써 rifampicin 내성여부를 쉽게 확인할 수 있음이 보고되면서 이를 임상에 응용하기 위하여 보다 간편하고 비전문적인 인력으로 실험이 가능한 방법의 개발이 활발히 이루어졌다. Telenti 등은 PCR-SSCP법을 이용하여 96.9%의 양성율을 보고하였고⁷⁾, Kapur 등은 자동 염기서열분석기를 이용하여 90% 이상의 감수성을¹²⁾, Whelen 등은 heminested PCR을 이용하여 87.8%의 감수성을¹³⁾, 그리고 De Beenhouwer 등은 PCR line probe법을 이용하여 97.0%의 감수성을 보고하였다⁸⁾.

그러나 이러한 대부분의 연구는 서구 환자의 검체에서 분리된 결핵균주를 대상으로 하였으며, 서구에서 약제내성 결핵환자의 대부분은 면역결핍상태인 점을

감안하면, 부적절한 약제복용이 약제내성의 주요 원인인¹⁾ 한국의 약제내성 결핵환자에서 분리된 결핵균주와는 유전자 변이가 다를 가능성을 배제할 수 없다. 김 등¹⁰⁾은 일부 한국의 약제내성 결핵환자에서 분리된 결핵균주의 유전자의 차이를 보여주지만 전체적으로는 비슷한 돌연변이 양상을 보여주므로 국내에서도 같은 분자생물학적 방법으로 rifampicin 내성을 빠르게 진단할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

국내의 데이터를 보면, 심 등¹⁵⁾은 PCR-SSCP법을 이용하여 한국의 약제내성 결핵환자에서 분리된 결핵균주에서 100%의 감수성과 100%의 특이도를 보고하였으며, 염기서열 분석법에 비해 방법이 용이하다고 발표한 바 있다. 반면에 박 등의 연구에서는 PCR-SSCP법으로 47.2%에서만 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 발견하여 낮은 특이도를 보였다(발표 안됨). 이는 PCR-SSCP법에서 적절한 실험조건을 맞추는 것이 중요함을 의미한다. 본 연구에서는 rifampicin 내성의 69.7%만 검출하여 적절한 실험조건을 잡지 못했을 가능성이 있다. 국내에서 발표된 PCR line probe 법¹⁷⁻¹⁹⁾은 69-94% 정도의 진단율을 보고하여 본 연구의 81.8%와 비슷한 결과를 보여주었다. 본 연구의 결과에서는 rifampicin 내성균주에서 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출율은 PCR line probe 법이 81.8%로 PCR-SSCP의 69.7%보다 약간 우수한 결과를 보여주었지만 통계적으로 유의하지는 않았고, PCR-SSCP법에서 더 다양한 실험조건을 시도하여 가장 적절한 조건하에서 실험하였다면 더 좋은 결과를 보였을 가능성도 있다.

본 연구에서 사용한 PCR line probe 법은 벨기에의 Innogenetics사에서 상업적으로 개발한 진단 kit로서 진단에 최소 48시간이 소요되며⁸⁾, 통상적으로는 1주일 정도면 결과를 알 수 있고, 본 연구의 결과처럼 100%의 특이도와 80% 이상의 감수성은 PCR-SSCP법의 결과와 함께 매우 고무적이며, 향후 임상에 응용될 수 있음을 보여주고 있다.

결핵균의 rifampicin 내성은 INH를 비롯한 다른 약제에도 동시에 내성을 보이는 이른바 다제내성의 지표

로 볼수 있는데^{1,7)}, 본 연구에 사용된 결핵균주들도 INH, RFP 동시 내성인 경우가 90.9%(30/33), INH, RFP 및 타약제에 동시내성인 경우가 90.9%(30/33)로 같은 양상을 보여주고 있다. 즉 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 확인 될 경우, 이는 rifampicin은 물론 INH에도 동시 내성임을 강력하게 시사하므로 돌연변이의 빠른 진단은 임상적 의미가 더욱 크다 하겠다.

결론적으로 PCR-line probe법은 PCR-SSCP법과 더불어 rifampicin 내성을 조기에 진단할 수 있는 좋은 방법으로 사료된다. 임상에서 모든 결핵 환자를 대상으로 이러한 검사를 시행하는 것은 부적절하지만, 치료에 반응이 불량하여 전통적인 감수성검사 결과를 확인하기 위하여 2-3개월을 기다릴 수 없는 경우나, 약제복용의 병력이 불규칙하여 약제내성이 의심되는 경우등 선별하여 사용한다면 유용하리라 판단되며, 향후 이러한 환자군을 대상으로 한 전향적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

Rifampicin은 항결핵 단기요법의 근간이 되는 약제로 rifampicin 내성은 다제내성의 지표이기도 하다. *rpoB* 유전자는 rifampicin이 결합하여 약리작용을 나타내는 RNA polymerase의 β -subunit을 coding하는 유전자이며 rifampicin내성 결핵균의 약 96%에서 돌연변이가 관찰된다. 그러므로 rifampicin내성결핵을 빠르게 진단할 수 있는 유용한 방법을 확인하기 위하여 PCR-line probe법과 PCR-SSCP법을 이용하여 다음의 연구를 시행하였다.

방 법 :

대한 결핵연구원의 약제감수성검사상 rifampicin 내성인 결핵균주 33예와 감수성인 결핵균주 12예를 대상으로 하였다. 각각 배양균 집락에서 DNA를 분리한 후, PCR-line probe법과 PCR-SSCP법을 이용하여 rifampicin 내성 여부를 단일맹검적으로 검사하

였고, 이를 약제감수성검사 결과와 비교하였다.

결 과 :

PCR-line probe법으로는 내성균주 33예중 27예(81.8%)에서 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 확인할 수 있었고, 감수성균주 12예는 모두 *rpoB* 유전자의 돌연변이는 없었다. PCR-SSCP법으로는 내성균주 33예중 23예(69.7%)에서 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 확인할 수 있었고, 감수성균주 12예는 모두 *rpoB* 유전자의 돌연변이는 없었다. Rifampicin내성균주에서 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출율의 PCR-line probe법과 PCR-SSCP법간의 차이는 없었다($p=0.25$).

결 론 :

PCR-line probe법은 PCR-SSCP법과 더불어 rifampicin 내성을 조기에 진단할 수 있는 좋은 방법으로 사료되며, 전통적인 약제감수성검사 결과를 기다릴 수 없는 국한된 환자에게 유용한 진단법으로 생각된다.

중심단어 : 리팜피신, 약제내성, 결핵, *rpoB*, Line probe assay, SSCP

참 고 문 헌

1. 보건사회부, 대한결핵협회 : 제7차 전국결핵실태조사 결과. p36, 서울, 보건사회부. 대한결핵협회, 1995
2. Culliton B : Drug-resistant TB may bring epidemic. Nature 356:473, 1992
3. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK : Mycobacterium, In Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ(Ed.) Manual of Clinical Microbiology, 5th Ed., p304, Washington DC, American Society for Microbiology 1991
4. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowroce D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K,

- Bodmer T : Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341 : 647, 1993
5. Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM : The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 38 : 805, 1994
 6. Williams DL, Waguesrack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gills TP : Characterization of rifampin resistance in pathogenic *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother* 38 : 2380, 1994
 7. 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* 37 : 2054, 1993
 8. 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 Dis* 76 : 425, 1995
 9. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F : Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay or the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 41 : 2093, 1997
 10. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT : Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol* 35 : 1281, 1997
 11. Hunt JM, Roberts GD, Stockman L, Felmlee TA, Persing DH. Detection of a genetic locus encoding resistance to rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* cultures and in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 18 : 219, 1994
 12. 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 beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 32 : 1095, 1994
 13. 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, 1995
 14. Felmlee 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. *J Clin Microbiol* 33 : 1617, 1995
 15. 심태선, 유철규, 한성구, 심영수, 김영환 : 결핵균의 *rpoB* 유전자 PCR-SSCP법에 의한 Rifampicin 내성의 신속 진단. *결핵 및 호흡기 질환* 43 : 842, 1996
 16. 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. *J Clin Microbiol* 35 : 492, 1997
 17. 이민기, 김윤성, 이효진, 전두수, 윤상명, 박삼

- 석, 김철민, 박순규 : 염기서열결정과 Line Probe 분석법에 의한 Rifampin내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 분석. 결핵및 호흡기질환 44 : 251, 1997
18. 이미경, 박애자, 전희선 : Line probe assay를 이용한 rifampin 내성 결핵균의 조기검출. 대한임상병리학회지 17 : 269, 1997
19. 박영길, 조상현, 심명섭, 배길한, 김상재, 송철용 : Line Probe Assay를 이용한 결핵균의 Rifampicin 내성 검사. 대한미생물학회지 31 : 7, 1996
20. Hurley SS, Splitter GA, Welch RA : Rapid lysis technique for Mycobacterial species. J Clin Microbiol 25 : 2227, 1987
21. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. Nature 358 : 591, 1992
22. Morris S, Bai GH, 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, 1995
23. Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs WR Jr, van-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
24. Heym B, Alzari PM, Honore N, Cole ST : Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol 15 : 235, 1995
25. Rouse DA & Morris SL : Molecular mechanisms of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis. Infect Immun 63 : 1427, 1995
26. Shim TS, Yoo C-G, Han SK, Shim Y, Kim YW : Isoniazid resistance and the point mutation of codon 463 of *katG* gene of Mycobacterium tuberculosis. J Kor Med Sci 12 : 92, 1997
27. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR : *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. Science 263 : 227, 1994
28. Wilson TM, Collins DM : *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the Mycobacterium tuberculosis complex. Mol Microbiol 19 : 1025, 1996