

Molecular Analysis of Isoniazid-Resistance Related Genes of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Korea

Joo Hwan Hwang¹, Eun Young Jeong¹, Yeon Im Choi¹, Kiho Bae²,
Taek Sun Song³, Sang-Nae Cho³ and Hyeyoung Lee^{1†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, ²Department of Life Science, College of Liberal Arts and Sciences, Yonsei University, Wonju 220-710, ³Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

Resistance to isoniazid (INH), which is one of the most important drugs in *Mycobacterium tuberculosis* chemotherapy, has been associated with mutations in genes encoding the mycobacterial catalase-peroxidase (*katG*), the enoyl acyl carrier protein (ACP) reductase (*inhA*), alkyl hydroperoxide reductase (*ahpC*), beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase (*kasA*), and NADH dehydrogenase (*ndh*). In this study, we examined INH-resistance related genes in 50 INH-resistant and 24 INH-susceptible isolates by PCR-sequence analysis. In brief, mutations at the *katG* gene were found at codon 315 alone (2/50), at codon 463 alone (19/50), and both at 315 and 463 (29/50). However, while mutations at codon 315 were only detected in INH-resistant isolates, mutations at codon 463 were also detected in INH-susceptible isolates indicating mutations at 463 alone do not seem to confer resistance to INH. Similar to the case of *katG* 463, some of *inhA* mutations were also found among INH-susceptible isolates. For example, whereas mutations at 8 upstream of the start codon (UPS) and 15 UPS of the *inhA* gene were detected only in INH-resistant isolates, mutations at 101, 115, and 125 UPS were detected only in INH-susceptible isolates. Many different kinds of mutations were detected in INH-resistant isolates at *ahpC*, *oxyR* gene, and intergenic region of the *oxyR-ahpC* genes. However, the mutations were not found *oxyR* and the intergenic regions in INH-susceptible isolates. No mutations were found at either *kasA* or at *ndh* gene among INH-resistant isolates. In conclusion, some of mutations such as *katG* 315, *inhA* promoter region, and *oxyR-ahpC* seem to be strongly related to INH-resistance. Currently we are developing a molecular diagnostic method based on these results.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Isoniazid resistance, Drug resistance-related genes

서 론

Isoniazid (INH)는 화학명인 이소니코틴산히드라지드 (isonicotinic acid hydrazide)의 머리글자를 딴 약칭이다 (Hatfull and Jacobs, 2000). 1898년 화학물질로 합성되었고, 1952년 결핵균에 대해 효과가 있음이 밝혀진 이래 현재까지 전 세계적으로 폐결핵 환자에게 권장되고 있다. INH는 Rifampicin (RIF), Pyrazinamide (PZA)와 더불어 결핵 치료의 필수 약제 중의 하나로 널리 사용되고 있다 (Rattan, 1998). INH는 결핵

균 외에서는 inactive한 pro-drug의 상태로 존재하나 passive diffusion에 의해 균 내로 들어오게 되면 catalase peroxidase에 의해 active한 상태로 전환된다. 이어 여러 가지 다양한 drug target (e.g. mycolic acid synthesis, DNA damage, lipid peroxidation, and NAD metabolism)과 반응하게 되어 결핵균을 사멸하는 효과를 가지는 것으로 알려져 있다 (Bardou et al., 1998).

결핵균의 INH 내성 획득 기전은 아직까지 완전히 밝혀진 것은 아니지만, 현재까지의 연구 결과에 의하면 결핵균 내의 몇몇 유전자 부위에 존재하는 돌연변이와 연관이 있는 것으로 알려져 있다 (Ramaswamy et al., 2003). 여러 가지 다양한 유전자 부위의 돌연변이가 INH 내성에 관여하지만, 그 중에서 catalase-peroxidase를 encoding하는 *katG* enoyl acyl carrier protein (ACP) reductase를 encoding하는 *inhA* alkyl hydroperoxide reductase를 encoding하는 *ahpC* beta-ketoacyl ACP synthase를 encoding하는 *kasA* 그리고 NADH dehydrogenase를

*논문 접수: 2005년 11월 12일

수정재 접수: 2005년 12월 2일

†교신저자: 이해영, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 매지리 234, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

Tel: 033-760-2740, Fax: 033-760-2195

e-mail: hylee@dragon.yonsei.ac.kr

encoding하는 *ndh*의 이상 5가지 유전자들이 INH 내성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다 (Lee AS et al., 1999; Lee AS et al.; 2001, Ramaswamy et al., 2003).

본 연구에서는 향후 신속하고 정확하게 결핵균의 INH 내성을 검출할 수 있는 분자생물학적인 방법을 개발하기 위해 유용한 marker를 발견하고자 하였다. 이를 위해 한국에서 분리된 INH 내성균주를 대상으로 INH 내성과 관련된 5가지 유전자 (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, *ndh*)에 돌연변이가 존재하는지 여부 및 각 돌연변이의 유형 및 빈도를 분석함으로써 이들 유전자의 INH 내성과의 관련여부를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

국립마산결핵병원의 결핵 환자들로부터 채취한 샘플 가운데 결핵균 배양검사를 통해 결핵으로 판명된 균주를 대상으로 Löwenstein-Jensen 배지에서 절대농도법을 이용하여, 약제 감수성 검사를 수행하였다. 미리 설정된 농도의 약제가 포함된 배지에서 균주가 성장할 때 내성으로, 균주가 성장하지 않을 때 감성으로 정의하여 내성 50 균주와 감성 24 균주를 대상으로 실험을 수행하였다.

배지에 포함된 각 약제의 내성 기준 농도는 INH 0.2 µg/ml; RIF 40 µg/ml; ofloxacin (OFX) 2 µg/ml; para-aminosalicylic acid 1 µg/ml; streptomycin 10 µg/ml; ethambutol 2 µg/ml; ethionamide 2 µg/ml; cycloserine 30 µg/ml; kanamycin 40 µg/ml; PZA는 pyrazinamidase test로 내성여부를 검사하였다. 표준균주로는 *M. tuberculosis* H37Rv를 사용하였다.

2. 결핵균 DNA의 분리

Ogawa 배지에서 배양된 균은 생리식염수에 현탁하여 70°C에서 20분간 불활성화 시키고 원심분리하여 모은 뒤 상층액을 버리고 400 µl TEN (0.1 M Tris-Cl, 0.01 M EDTA, 1 M NaCl) 완충액에 부유시킨 후, 동량의 saturated phenol과 지름 0.1 mm의 zirconium bead를 넣고 2분 40초 동안 minibeat-beater에서 저속으로 진탕하고 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 400 µl에 120 µl의 5 M NaCl과 100 µl의 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)/NaCl (10% CTAB, 0.7 M NaCl)을 첨가하고 혼합한 후 70°C에서 20분간 가온기에서 처리하였다. 가온 후 200 µl의 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 가하여 섞은 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액에 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 가하고 잘 혼합한 후 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액에 3배의 무수네테탄올을 첨가하고 잘 흔든 후 -20°C에 하룻밤 방치하고 다음 날 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를

70% Ethanol로 세척한 다음 물기를 제거하고 공기 중에 건조시켰다. 30 µl 멸균 증류수에 DNA를 녹인 후 정량하고 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

3. 프라이머 설계

프라이머는 Rohde 등 (2002)의 방법에 준하여 합성하였고 프라이머의 설계는 현재까지 알려진 결핵균의 INH 내성획득과 관련된 *katG*, *inhA* promoter region, *oxyR-ahpC* intergenic region, *kasA*, *ndh* 유전자의 5가지 유전자를 대상으로 프라이머를 디자인하였다. *katG* 유전자에서의 프라이머 디자인은 현재까지 INH 내성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있는 315 부위와 결핵균의 polymorphism과 관련이 있는 463 부위를 증폭할 수 있도록 디자인하였다. *inhA* 유전자에서의 프라이머 디자인은 *inhA* 유전자의 promoter region을, *ahpC* 유전자에서는 *oxyR-ahpC* intergenic region을, *kasA*, *ndh* 유전자는 현재까지 돌연변이가 발견된 부위를 각각 3 부위와 2 부위로 나누고 서로 증폭될 수 있게 증폭할 수 있도록 디자인하였다 (Fig. 1).

4. DNA amplification

결핵균 내 *katG*, *inhA* promoter region, *oxyR-ahpC* intergenic region, *kasA*, *ndh* 유전자의 증폭은 Telanti 등의 방법을 변형하여 실시하였다. Primer의 염기서열은 Table 1에 나열하였다. PCR 반응 시에는 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 사용하였다. AccuPower® PCR PreMix의 조성은 다음과 같다: 최종볼륨이 50 µl인 경우, *Taq* DNA polymerase 2.5 U; dNTP 250 mM; Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM; KCl 40 mM; MgCl₂ 1.5 mM; Stabilizer and tracking dye. PCR 반응액에는 primer (10 pmol/µl)의 경우 1 µl 씩, 균에서 분리한 genomic DNA 5 µl와 43 µl의 증류수를 가해 최종적으로 50 µl로 만들었다. 이 모든 과정은 Filter Tip을 사용하였으며, 양성대조 (*M. tuberculosis* H37RV)와 음성대조 (DNA 주형 대신 증류수를 넣고 그 외 모든 조작을 동일하게 함)를 함께 실시하였다. 각 유전자에 대한 PCR 반응조건은 Table 1에 나열하였다.

PCR 증폭산물은 2% (w/v) agarose gel (Bioneer Co., Daejeon Korea)과 0.5 × TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 Mupid-α (Advance, Japan)을 이용하여 전기영동한 후 ethidium bromide 용액에 염색하여 Gel Doc EQ system (BIO-RAD, USA)로 DNA 밴드를 확인하였다. PCR 증폭산물의 크기를 확인하기 위해 100 bp DNA Ladder (Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 사용하였다.

5. 염기서열의 분석

각각의 유전자에 대한 PCR 산물의 염기서열을 분석하기

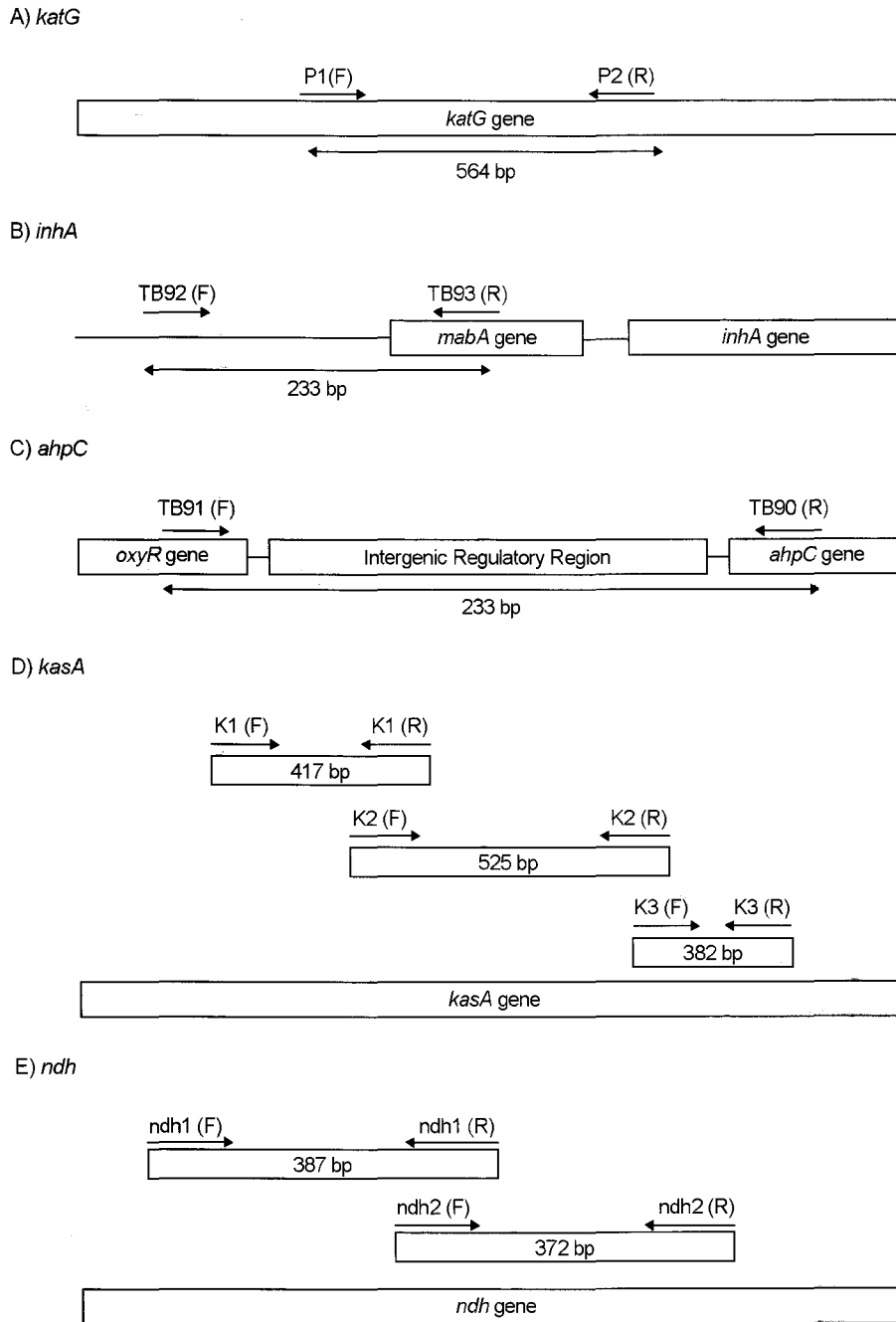


Fig. 1. Primer designed for PCR of INH resistance target genes.

위해 GENE CLEAN[®] III kit (Q-BIOgene, CA, USA)를 이용하여 PCR 산물을 정제한 뒤 염기서열 분석을 제노텍 (Genotech, Daejeon, Korea)에 의뢰하였다.

결 과

1. *katG* 내에서의 돌연변이 분석

PCR-염기서열 분석을 이용하여 INH 내성 결핵균주에

katG 내에 돌연변이가 존재하는지의 여부와 돌연변이의 유형을 분석하였다. 그 결과 50 내성균주에서는 315 부위와 463 부위에서, 감성균주에서는 463 부위에서 돌연변이가 발견되었고 315 부위에서는 G에서 C로의 point mutation에 의해 Ser가 Thr으로 치환된 돌연변이 (31/50)가 발견되었고 463 부위에서는 G에서 T로의 point mutation에 의해 Arg이 Leu으로 치환된 돌연변이가 발견되었다 (Fig. 2). INH 내성균주에서는 315와 463 부위에 돌연변이가 발견되었는데 반해

Table 1. PCR primers and conditions for amplification of INH resistance related target genes

Target gene	Name	Primer-sequence	Product size (bp)	Anneal. Tm (°C)	Direction
<i>katG</i>	katP1	5'-TCACCAGCAGCATCGAGGT-3'	564	65.0	forward
	katP2	5'-ACCCGCCACGCAGCAGC-3'			reverse
<i>inhA</i>	TB92	5'-CGCTGCCCAGAAAGGGA-3'	233	61.0	forward
	TB93	5'-CCCCGGTTTCTCCGGT-3'			reverse
<i>oxyR-ahpC</i>	TB91	5'-ACTGCTTTGCCACC-3'	233	68.0	forward
	TB90	5'-GACAAGTGGCGAGAGTAGC-3'			reverse
<i>kasA</i>	kas1F	5'-CGTTCAGGCGAGGCTTGAGG-3'	417	60.0	forward
	kas1R	5'-CACCGTTGGGCATGATCATC-3'			reverse
	kas2F	5'-GGTGCCTAATGCTCATCGAG-3'	525		forward
	kas2R	5'-CATTAAACGCCGAAGGCGAGC-3'			reverse
	kas3F	5'-GTCGAGAGCTACGACCTGATG-3'	382		forward
	kas3R	5'-CTCGATGAGCATCAGCGACC-3'			reverse
<i>ndh</i>	ndh2F	5'-GCAATGTCCAGGTAAGTGTG-3'	387	57.0	forward
	ndh2R	5'-CCTTGGTCGAGTCGATGTG-3'			reverse
	ndh3F	5'-GACAGATCGCCGAGCTGGC-3'	372		forward
	ndh3R	5'-TGGACAGGTCGGCAGCAC-3'			reverse

INH 감성균주에서는 315 돌연변이는 발견되지 않고 463 돌연변이만이 발견되었다. 315와 463 부위에서의 돌연변이가 발생한 균주가 29 균주 (58%), 315 부위에서만 발견된 균주가 2 균주 (4%), 그리고 463 부위에서만 돌연변이가 있는 균주는 내성균주 가운데 19 균주 (38), 감성균주 가운데 7 균주이었다 (Table 2).

2. *inhA* 내에서의 돌연변이 분석

PCR-염기서열 분석을 이용한 *inhA* 내에서의 돌연변이 유형 분석 실험 결과 *inhA* 내에서 보다는 *inhA* promoter region 에서 돌연변이가 발견되었다. 내성균주에서는 8 UPS와 15 UPS에서, 감성균주에서는 101 UPS, 115 UPS, 그리고 125 UPS에서 돌연변이가 발견되었다. 8 UPS에서는 T가 C로 치환되었고, 15 UPS에서는 C가 T로 치환되었으며, 101 UPS에서는 A가, 115 UPS에서는 G 혹은 A가, 125 UPS에서는 A가 삽입되었다 (Fig. 3). INH 내성균주에서는 8 UPS와 15 UPS 돌연변이만 발견되었는데 8 UPS에서 돌연변이가 발견된 균주는 1 (2%), 15 UPS에서 돌연변이가 발견된 균주는 11 균주 (22%), 그리고 돌연변이가 없는 균주가 38 균주 (76%)의 빈도로 나타났다. INH 감성 균주에서는 8과 15 UPS 돌연변이가 발견되지 않았다. 101 UPS에서 돌연변이가 발견된 균주가 1 균주 (5%), 115 UPS에서 돌연변이가 발견된 균주가 10 균주 (45%), 125 UPS에서 돌연변이가 발견된 균주가 1 균주 (5%), 101과 115 UPS에서 돌연변이가 발견된 균주가 2 균주 (10%), 115와 125 UPS에서 돌연변이가 발견된 균주가 1 균

주 (5%)의 빈도로 돌연변이가 발견되었으며 이들 돌연변이도 INH 내성균주에서는 발견되지 않았다 (Table 3).

3. *ahpC* 내에서의 돌연변이 분석

ahpC 내에서의 돌연변이 유형 분석 실험 결과 내성균주에서는 *oxyR*, *ahpC* 그리고 *oxyR-ahpC* intergenic region 내에서 돌연변이가 발견된 반면, 감성균주에서는 intergenic region 내에서는 돌연변이가 발견되지 않았다 (Fig. 4). Intergenic region 돌연변이 종류는 36 position에서 T가 삽입되었고, -10 position에서 C가 T로 치환되었으며, -16 position에서 A가 G로 치환이 일어났다. 하지만 이들 돌연변이는 INH 감성균주에서는 발견되지 않았다. *oxyR-ahpC* intergenic region 이외 부위에서 발견된 돌연변이는 *oxyR*에서 29 부위에서 A가 C로, *ahpC* 유전자 2 부위의 A가 G로, 5 부위의 C가 A로, 16 부위의 C가 G로 치환된 돌연변이가 발견되었다. 그러나 16 부위의 C가 G로 치환된 돌연변이는 INH 감성균주 1 균주에서도 발견되었다 (Table 4).

4. *kasA* 내에서의 돌연변이 유형 분석

앞서 분석한 유전자 부위와는 달리 *kasA* 내에서 어떠한 종류의 돌연변이도 발견되지 않았다. 반면에, 감성 균주에서만 코돈 164 부위의 G가 A로 치환된 돌연변이가 실험에 사용한 24 INH 감성균주 가운데 한 균주에서 발견되었다.

5. *ndh* 염기서열 분석

katG, *inhA*, *oxyR-ahpC* intergenic, 그리고 *kasA* 유전자 분석을 마친 결과를 토대로 INH 내성균주나 유전변이가 발견되지 않은 7 균주를 대상으로 *ndh* 유전자에 돌연변이가 존재하는지 여부를 PCR-염기서열 분석을 통해 확인하였다. *ndh* 유전자 내에서 돌연변이 빈도가 높다고 알려져 온 (Lee, et al., 2001) 코돈 110 부위와 코돈 268 부위를 대상으로 실험한 결과 7 균주 모두에서 돌연변이는 발견되지 않았다.

고 찰

최근 들어 전 세계적으로 INH와 RIF을 포함한 최소한 두 가지 이상의 항결핵제에 동시내성을 가진 다제내성 결핵 환자의 증가로 인하여, 내성균 전파의 위험성과 약제 선택의 어려움이 증가 되고 있는 실정이다 (Bloch et al., 1994; Cohn et al., 1997; McGray et al., 1997; Corbett et al., 2003). 결핵의 진단이 임상 증상, 방사선학적 소견, 객담 또는 기타 검체의 결핵균 도말 및 배양검사에 주로 의존하고, 다제내성 결핵의

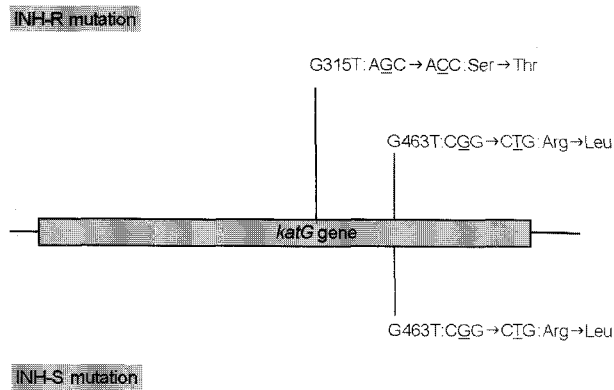


Fig. 2. Mutations found in the *katG* gene from INH-resistant and INH-susceptible clinical isolates of *M. tuberculosis*. Mutations marked on the upper part found among INH-resistant *M. tuberculosis*, whereas mutations on the lower part represent mutation found among INH-susceptible *M. tuberculosis*.

진단에는 약제 감수성 검사 결과가 필수적이다. 일반적으로 사용하는 고체배지를 이용한 약제 감수성 검사의 가장 큰 문제점은 내성여부를 확인하기 전까지 8주 이상의 시간이 소요되어 정확한 진단과 적절한 치료가 지체가 됨이 문제가 되고 있다. CDC (Centers for Disease Control)에서는 검체 채취 후 30일 이내에 결과를 임상에게 장려 (Tenover et al., 1993)하게 됨으로 인해, 신속하게 약제 감수성 검사를 하기 위한 여러 가지 다양한 방법들이 개발되고 이용되고 있다 (Johansen et al., 2004).

최근에는 분자생물학의 발달로 결핵균의 약제내성에 관여하는 여러 유전자들이 발견되어 이를 이용한 신속한 검사법들이 시도되고 있다. 따라서 정확한 검사법 개발을 위해서는 결핵균의 항결핵제 내성과 관련된 유전자에 대한 정보가 필수불가결하다고 생각된다. 본 연구에서는 분자생물학적 기법의 개발을 위해 INH 내성과 관련되어 있다고 알려진 5가지 유전자 부위 (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, and *ndh*)를 분석하였다.

katG 유전자의 경우 315 부위에서의 돌연변이는 INH 내성균주에서만 발견되었고 감성균주에서는 발견되지 않았다. 이와 반대로 463 부위에서의 돌연변이는 INH 내성과 감성균주 모두에서 발견되었기 때문에 INH 내성획득에 관련되어 있기 보다는 결핵균의 polymorphism에 기인하는 것으로 생각된다.

*inhA*의 경우에는 *inhA* gene 내에서 돌연변이가 발견되지 않은 반면, *inhA* gene의 promotor 부위에서 돌연변이가 발견되었다. 8과 15 UPS 돌연변이는 INH 내성균주에서만 발견되었고 INH 감성균주에서는 발견되지 않았기 때문에 8과 15 UPS는 INH 내성과 관련이 있다고 생각된다. 한편 101, 115, 그리고 125 UPS에서의 돌연변이는 감성균주에서만 발견되었기 때문에 이들 부위의 돌연변이 또한 INH 내성획득에 관련되어 있다기 보다는 polymorphism에 관계가 있다고 생각된다.

*ahpC*의 경우에는 *oxyR* gene, *ahpC* gene, 그리고 *oxyR-ahpC* intergenic region에서의 돌연변이가 INH 내성균주에서 발견되었고, 감성균주에서는 *oxyR* gene과 *oxyR-ahpC* intergenic

Table 2. Types of mutations found in the *katG* gene from INH-resistant and INH-susceptible clinical isolates of *M. tuberculosis*

Phenotype (n)	Codon	Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	No. (%) of isolate with indicated mutation
INH-R (50)	315	G → C	AGC → ACC	Ser → Thr	29 (58)
	463	G → T	CGG → CTG	Arg → Leu	
	315	G → C	AGC → ACC	Ser → Thr	2 (4)
	463	G → T	CGG → CTG	Arg → Leu	19 (38)
	NM				0 (0)
INH-S (24)	463	G → T	CGG → CTG	Arg → Leu	7 (29)
		NM			17 (71)

Table 3. Types of mutations found in the *inhA* gene from INH-resistant and INH-susceptible clinical isolates of *M. tuberculosis*

Phenotype (n)	UPS	Mutation	Nucleotide change	No. (%) of isolates with indicated mutation
INH-R (50)	8 US	T → C	TAGG <u>T</u> T → TAGG <u>C</u> T	1 (2)
	15 UPS	C → T	AGAC <u>C</u> GA → AGAT <u>T</u> GA	11 (22)
		NM		38 (76)
INH-S (24)	101 UPS	A insertion	CGAGCG → CGAAGCG	1 (5)
	115 UPS	A insertion	CGACAA → CGA <u>A</u> CAA	1 (5)
	115 UPS	G insertion	CGACAA → CG <u>G</u> ACAA	9 (40)
	125 UPS	A insertion	GAGTCA → GA <u>A</u> GTCA	1 (5)
	101 UPS	A insertion	CGAGCG → CGAAGCG	
	115 UPS	A insertion	CGACAA → CGAACAA	2 (10)
	115 UPS	G insertion	CGACAA → CG <u>G</u> ACAA	1 (5)
	125 UPS	A insertion	GAGTCA → GA <u>A</u> GTCA	
		NM		7 (20)

UPS: nucleotide position (base pairs) upstream of the start codon

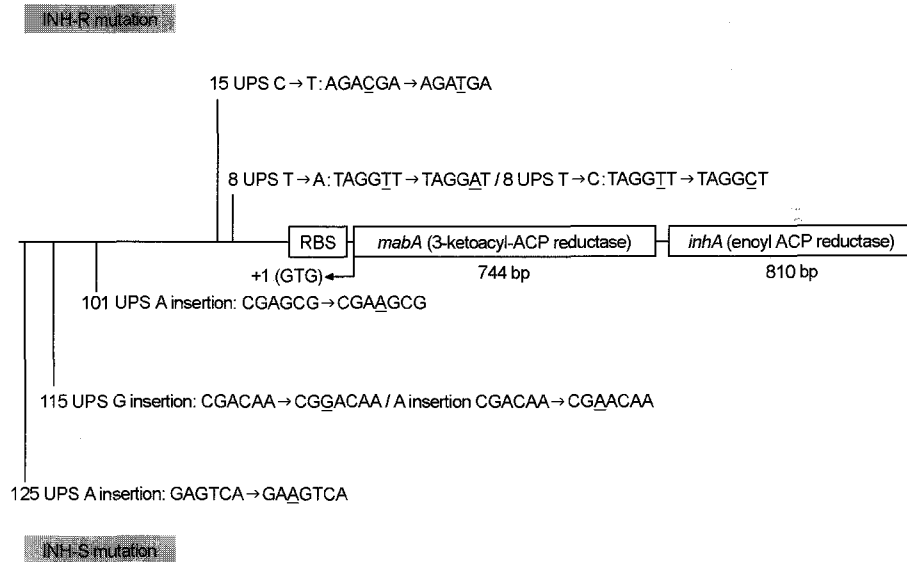


Fig. 3. Schematic presentation of mutations in the promoter region of the *inhA* gene from INH-resistant and INH-susceptible clinical isolates of *M. tuberculosis*. As in the Fig. 2, mutations found among INH-resistant and INH-susceptible isolates are shown on the upper part and lower part of the gene map.

region에서는 발견되지 않았다 (Table 4). 하지만 *katG* gene 이나 *inhA* promotor 부위에서와 같이 특정부위에서의 돌연변이가 높은 빈도로 발견되는 것이 아니라 intergenic region을 포함한 여러 부위에서 돌연변이가 발견되었기 때문에 내성과 관련된 정확한 부위를 알기 위해서는 더 많은 균주를 획득하여 실험하는 것이 필요하다고 생각된다.

*kasA*와 *ndh*의 경우에는 이전의 실험에서는 INH 내성과 관련이 있다고 보고되어 왔지만 (Lee et al., 1999, Lee et al., 2001) 이번 실험에서는 두 가지 유전자 부위 모두에서 내성 균주에서 돌연변이는 발견되지 않았다. 이러한 실험 결과는 두 가지 측면에 설명될 수 있을 것으로 생각된다. 첫째 이번

실험에서 사용한 결핵균주는 국립마산결핵병원에서 임상 분리된 균주이기 때문에 본 실험 결과가 우리나라에서 분리된 전체 결핵균주의 결과를 대표한다고 할 수 없을 것이다. 둘째로는 실제로 우리나라에서는 분리된 INH 내성 결핵균주의 INH 내성 획득에 *kasA*이나 *ndh*이 관련 없다는 점이다. 따라서 향후 국내의 다양한 지역 및 환자에서 분리된 INH 내성균주를 대상으로 *kasA* 및 *ndh*의 염기서열 분석이 필요할 것으로 사료된다.

본 실험 결과에 의하면 *katG inhA* promotor region, 그리고 *ahpC*이 INH 내성에 약 86% 정도 관련되어 있는 것으로 보인다 (Baker et al., 2005). 이러한 결과를 통해 INH 내성균주

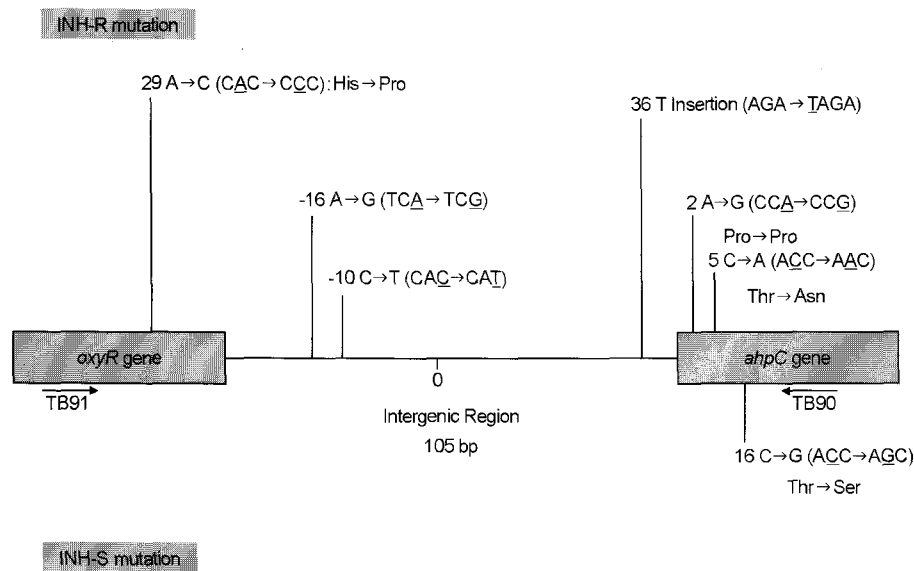


Fig. 4. Schematic presentation of mutations in the *oxyR-ahpC* region from INH-resistant and INH-susceptible clinical isolates of *M. tuberculosis*.

Table 4. Types of mutations found in the *oxyR-ahpC* intergenic region from INH-resistant and INH-susceptible clinical isolates of *M. tuberculosis*

Phenotype (n)	Position	Mutation	Nucleotide change	Amino acid change	No. (%) of isolate with indicated mutation
INH-R (50)					
<i>oxyR</i> gene	29	A → C	<u>CAC</u> → <u>CCC</u>	His → Pro	3 (6)
intergenic region	-10	C → T	<u>CAC</u> → <u>CAT</u>		2 (4)
<i>ahpC</i> gene	16	C → G	<u>ACC</u> → <u>AGC</u>	Thr → Ser	3 (6)
	2	A → G	<u>CCA</u> → <u>CCG</u>	Pro → Pro	1 (2)
multiple mutation	5	C → A	<u>ACC</u> → <u>AAC</u>	Thr → Asn	1 (2)
	^a 2	A → G	<u>CCA</u> → <u>CCG</u>	Pro → Pro	
	ⁱ 36	T insertion	AGA → TAG		1 (2)
	^a 2	C → T	<u>CCA</u> → <u>CTA</u>	Pro → Pro	1 (2)
	^o 29	A → C	<u>CAC</u> → <u>CCC</u>	His → Pro	
	^a 2	C → T	<u>CCA</u> → <u>CTA</u>	Pro → Pro	
	^a 16	C → G	<u>ACC</u> → <u>AGC</u>	Trp → Ser	1 (2)
	ⁱ -16	A → G	<u>TCA</u> → <u>TCG</u>		
		NM			37 (74)
INH-S (24)					
<i>ahpC</i> gene	16	C → G	<u>ACC</u> → <u>AGC</u>	Thr → Ser	1 (4)
		NM			23 (96)

에서 *katG* 315 부위, *inhA* 8과 15 UPS, 그리고 *ahpC*의 3 부위를 분자생물학적 기법을 이용하여 검사함에 있어서 유용한 marker를 사용할 수 있다고 판단된다. 본 연구 결과를 바탕으로 검체 내 결핵균의 INH 내성관련 유전자를 분자생물학적 기법 (PCR-dot-blot hybridization 또는 reverse line blot hybridization)을 이용하여 분석한다면 INH의 내성여부를 신

속하게 알 수 있을 방법들이 개발될 것으로 생각된다. 이러한 방법들을 이용하면 임상적으로 다제내성 결핵이 의심되는 신환자, 초치료 실패자, 재발자, 그리고 중단 후 재치료자 등에 대한 신속한 처방결정과 약제내성 결핵 환자의 접촉자에 대한 예방화학치료 처방의 결정에도 도움을 줄 수 있다고 여겨진다. 그러나 아직까지는 INH 내성을 100% 검

출할 수 없으므로 검체로부터 위에 언급된 바와 같은 분자생물학적 방법을 적용하는 데는 제한점이 있다. 따라서 INH 내성과 관련된 유전자의 분석과 관련된 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2002년도에 선정된 한국학술진흥재단의 신진교수지원사업 연구비 (KRP-2002-003-E00140) 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD, Drobniewski FA. Molecular Analysis of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from England and Wales Reveals the Phylogenetic Significance of the *ahpC* -46A Polymorphism. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2005. 49: 1455-1464.
- Bloch AB, Cauthen GM, Onorato IM, Dansbury KG, Kelly GD, Driver CR, Snider Jr. DE. Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United states. *JAMA.* 1994. 271: 665-671.
- Bulatovic VM, Wengenack NL, Uhl JR, Hall L, Roberts GD, Cockerill FR 3rd, Rusnak F. Oxidative Stress Increases Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2002. 46: 2765-2771.
- Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC. Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. J Clin Microbiol.* 1997. 33: 1720-1726.
- Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern. Med Assoc.* 2003. 163: 1009-1021.
- Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2001. 14: 836-871.
- Huang TS, Lee SS, Tu HZ, Huang WK, Chen YS, Huang CK, Wann SR, Lin HH, Liu YC. Use of MGIT 960 for rapid quantitative measurement of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex to ciprofloxacin and ethionamide. *J Antimicrobial Chemother.* 2004. 53: 600-603.
- Hatfull GF, Jacobs WR Jr. Molecular genetics of mycobacteria. 2000. pp 236-240. ASM press. Washington D.C., USA.
- Iademarco MF, Castro KG. Epidemiology of tuberculosis. *Semin Repir Infect.* 2003. 18: 225-240.
- Johansen IS, Thomsen VO, Marjamaki M, Sosnovskaja A, Lundgren B. Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004. 50: 103-107.
- Kim SY, Park YJ, Kim WI, Lee SH, Ludgerus Chang C, Kang SJ, Kang CS. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003. 47: 497-502.
- Lee AS, Lim IH, Tang LL, Telenti A, Wong SY. Contribution of *kasA* Analysis to Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrobial Agents Chemother.* 1999. 43: 2087-2089.
- Lee AS, Teo AS, Wong SY. Novel Mutations in *ndh* in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2001. 45: 2157-2159.
- McGray E, Weinbaum CM, Braden CR, Onorato IM. The epidemiology of tuberculosis in the United states. *Clin Chest Med.* 1997. 18: 99-113.
- Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC. *ethA*, *inhA*, and *katG* Loci of Ethionamide-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2003. 47: 3799-3805.
- Musser JM. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clin Microbiol Rev.* 1995. 8: 496-514.
- Piatek AS, Telenti A, Murray MR, El-Hajj H, Jacobs WR Jr, Kramer FR, Alland D. Genotypic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Two Distinct Populations Using Molecular Beacons: Implications for Rapid Susceptibility Testing. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2000. 44: 103-110.
- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998. 79: 3-29.
- Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2003. 47: 1241-1250.
- Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerg Infect Dis.* 1998. 4: 195-209.
- Raviglione MC. The TB Epidemic from 1992 to 2002. *Tuberc. (Edinb).* 2003. 83: 4-14.
- Wang JY, Burger RM, Drlica K. Role of Superoxide in Catalase-

Peroxidase-Mediated Isoniazid Action against Mycobacteria.
Antimicrobial Agents Chemother. 1998. 42: 709-711.

Vilcheze C, Weisbrod TR, Chen B, Kremer L, Hazbon MH, Wang
F, Alland D, Sacchetti JC, Jacobs WR Jr. Altered NADH-

NAD⁺ Ratio Mediates Coresistance to Isoniazid and Ethio-
namide in Mycobacteria. *Antimicrobial Agents Chemother.*
2005. 49: 708-720.