

한국에서 분리된 리팜핀 내성 균주에서의 리파부틴 감수성 정도 및 관련 *rpoB* 유전자 돌연변이의 특성에 관한 연구

대한결핵협회 결핵연구원

류우진, 박영길, 김희진, 장철훈, 배길한, 김성규

The Proportion of Rifabutin-susceptible Strains among Rifampicin-resistant Isolates and Its Specific *rpoB* Mutations

Woo Jin Lew, M.D., Young Kil Park, Ph.D., Hee Jin Kim, M.D., Chulhun Chang, M.D., Gill Han Bai, Ph.D., Sung Kyu Kim, M.D.

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

Background : Rifabutin (ansamycin) is a spiro-piperidyl rifamycin, which is highly active against *Mycobacterium tuberculosis*. It has been found that some clinical isolates of tubercle bacilli that are resistant to rifampicin are susceptible to rifabutin, with some patients with multi-drug resistant pulmonary tuberculosis having shown favorable clinical and bacteriological responses to the rifabutin. This study was conducted to find the proportion of rifabutin-susceptible strains among rifampicin-resistant isolates from Korean MDR-TB patients, and investigate the presence of specific *rpoB* mutations, which may confer resistance to rifampicin, but not to rifabutin.

Methods : 201 rifampicin-resistant and 50 pan-susceptible *M. tuberculosis* isolates were randomly selected for this study. The isolates were retested at rifampicin and rifabutin concentrations of 0, 20, 40 and 80 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The isolates that grew at and/or over a rifabutin concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ were judged rifabutin-resistant.

The *rpoB* gene was extracted from the isolates, and then amplified for direct sequencing to investigate specific *rpoB* mutations that conferred rifabutin-susceptibility but rifampicin-resistance.

Results : Out of the 201 rifampicin-resistant *M. tuberculosis*, 41 strains (20.4%) were susceptible to rifabutin using the absolute concentration method on Lowenstein-Jensen media. The *rpoB* mutation types that showed susceptibility to rifabutin were Leu511Pro, Ser512Arg, Gln513Glu, Asp516Ala, Asp516Gly, Asp516Val, Asp516Tyr, Ser522Leu, His526Asn, His526Leu, His526Cys, Arg529Pro and Leu533Pro. A reverse hybridization technique was able to detect 92.5% of the rifabutin-susceptible isolates, with a specificity of 96.1% among 195 *M. tuberculosis* isolates with the *rpoB* mutation.

Conclusions : Around 20% of the rifampicin-resistant isolates in Korea showed susceptibility to rifabutin, which was associated with some specific mutations of *rpoB*. Rifabutin could be used for the treatment of MDR-TB patients, especially when drug susceptibility testing reveals susceptibility to rifabutin. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 59: 257-265)

Key words : Rifabutin, MDR-TB, *rpoB* mutation

서 론

리팜핀(rifampicin)은 1957년 이탈리아에서 최초로 *Streptomyces mediterranei*에서 추출되어 만들어진 반 합성 제제이며, 1966년에 결핵 재치료 약제로서 임상에 처음 소개되기 시작한 이후로 오늘날에는 아이

소니아짓(isoniazid)과 피라지나마이드(pyrazinamide)와 함께 결핵 초치료 처방의 가장 대표적이고 필수적인 약제로서 널리 사용되고 있다. 리팜핀은 세균의 DNA dependent RNA polymerase의 β -subunit에 결합하여 RNA 합성 개시하는 것을 방해하여 항균 작용을 나타내는데, 리팜핀이 결합하는 바로 이 부위의 생성에 관여하는 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 내성 기전의 핵심이라고 할 수 있다¹.

리팜핀에 단독 내성이 있거나 또는 아이소니아짓에도 동시 내성을 보이는 다제 내성 결핵(MDR-TB, Multi-Drug Resistant Tuberculosis)인 경우는 오늘날 전 세계의 표준 초치료 처방으로 널리 사용되고 있는 소위 6개월 단기 처방의 효과가 떨어지기 때문에² 2차 항결핵 약제로 구성된 재치료 처방으로 변경

본 연구는 보건복지부 보건과학기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(01-PJ10-PG6-01GM03-0002)

Address for correspondence : **Young Kil Park, Ph.D.**
Korean Institute of Tuberculosis 14 Woomyundong,
Sochogu, Seoul 137-900, Korea
Phone : 02-576-4986 Fax : 02-573-1914
E-mail : yprk7@empal.com
Received : Jun. 9. 2005
Accepted : Aug. 19. 2005

해야만 한다. 그러나 리팜핀이 제외된 재치료 처방은 상대적으로 효과가 낮고, 부작용이 더 많으며 장기간 사용해야만 되기 때문에 환자의 낮은 순응도와 함께 비용이 많이 든다는 문제를 안고 있다. 한편, 리파부틴(Rifabutin)은 리팜핀과 같은 계열인 rifamycin의 spiroperidyl 유도체로 만들어졌으며 1982년 미국에서 소개된 초기에는 리팜핀보다는 최소발육저지농도가 낮고 혈청반감기가 길며, 조직과 세포내 침투력이 높아 결핵균에 대한 항균력이 더 뛰어나서 리팜핀 내성 결핵 환자에서의 대체 약제로도 간주되었었다. 그러나 감수성을 보인 결핵 환자의 치료에 있어서 두 약제의 효과는 차이가 없었으며³, 리팜핀 내성 환자에서의 리파부틴 치료 성적도 실망적이었는데 그 이유는 RNA-중합효소 염색체의 돌연변이를 통한 내성이 같은 rifamycin 계열의 모든 약제들에게도 전달되기 때문이었다³. 이러한 이유로 우리나라에서는 리팜핀 내성 결핵 환자에서의 리파부틴 약제의 사용은 거의 고려되지 않았으나, *rpoB* 유전자의 돌연변이 중에서도 일부 유전자 부호(codon)의 변화에 따른 아미노산의 배열 위치 변경에 따라 리팜핀에는 내성이나 리파부틴에는 감수성인 균이 약 10-30%정도 존재함이 밝혀졌으며^{4,5} 실제 임상에서도 리팜핀 내성 환자에게 감수성을 보인 리파부틴을 사용하였을 때 치료 반응이 좋았으며⁶ 미국 호흡기 학회에서도 리파부틴이 감수성일 때는 리팜핀 내성 환자에게 사용토록 권하고 있다⁷.

따라서 저자들은 우리나라에서 분리된 리팜핀 내성 결핵균 중에서 리파부틴에는 감수성을 보이는 균의 비율이 어느 정도인지를 파악하여 다제내성 결핵 환자의 치료에 리파부틴 약제 사용의 가능성을 알아보고, 또한 리팜핀-내성, 리파부틴-감수성 결핵균의 *rpoB* 유전자 돌연변이의 특성도 알아보하고자 본 연구를 실시하였다.

방 법

1. 약제감수성검사

약제감수성 검사는 Löwenstein-Jensen (LJ) 배지에서 약제 함유 농도는, 아이소니아짓 0.2 $\mu\text{g/ml}$,

리팜핀 40 $\mu\text{g/ml}$, 스트렙토마이신 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 에탐부톨 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 가나마이신 40.0 $\mu\text{g/ml}$, 카프레오마이신 40.0 $\mu\text{g/ml}$, 프로치오나마이드 40.0 $\mu\text{g/ml}$, 사이클로세린 30.0 $\mu\text{g/ml}$, 파스 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 오플로삭신 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 으로 하였다. 대조배지 상 균 집락 수와 비교하여 1%이상의 균이 발육 시 각 약제에 내성인 것으로 판정 하였다. 피라지나마이드는 pyrazinamidase test로 내성 여부를 결정하였다⁸.

2. 시험균주 선정

전국에서 결핵연구원으로 의뢰되어온 결핵 균주 중 약제 감수성검사 결과 리팜핀 내성균 208주와 전 약제 감수성균 50주를 무작위로 선정하여 리파부틴 감수성 실험에 사용하였다.

3. 리파부틴 교차내성 실험

선정된 균주로 리팜핀과 리파부틴 교차내성 실험을 하기 위하여 LJ 배지에 두 약제를 0 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 함유하여 균 농도는 MacFaland scale #2 (약 6억개 균/ml)을 10분의 1로 희석하여 25 μl (최종 접종량 100만개 균)를 5ml의 LJ 배지에 접종한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1개월 배양하여 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 자란 균을 내성으로 판정하였고, 약제가 함유가 되지 않은 배지에서만 자란 균주를 감수성으로 판정하였다. 결과에 있어 의심스러운 균주는 반복 실험을 실시하였다.

4. 중합효소연쇄반응 및 염기서열 분석

시험 대상 결핵균의 DNA를 추출한 후 *rpoB* forward primer는 5' tgggccgcttgacgagggtcaga 3'를 사용했고, *rpoB* reverse primer는 5' 끝에 biotin을 붙인 5' ccctcaggggttcgatcgg 3'를 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소연쇄반응의 annealing 온도는 65 $^{\circ}\text{C}$ 이었고, 용량은 100 μl 이었고, 성분은 10 \times Taq polymerase buffer 10 μl , 2mM MgCl₂, 각 primer 20 pM, 2 mM의 4가지 dNTP, 1 U의 Taq

polymerase (AP-Biotech, Uppsala, Sweden) 그리고 50–200 ng의 DNA가 포함되었다. 중합효소 연쇄반응은 Perkin-Elmer 480 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Norwalk, CT, 06859 USA) 제품을 사용하여 실시하였다. 처음 denaturation 반응은 95°C 에서 10분 하였고, 이후 95°C 1분, 65°C 1분, 72°C 2분씩 중합효소 연쇄반응을 30회 반복 하였으며 마지막 extension 반응으로는 72°C 10분을 실시하였다.

중합효소연쇄반응 산물은 정제(QIA quick PCR purification kit; QIAGEN)한 다음 BigDye Terminator sequencing kit 3.1와 ABI PRISM 377/3100 자동 염기서열 분석기 (Applied Biosystems/HITACHI, USA)을 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석은 하나의 산물에 대하여 forward와 reverse primer 2회 실시하였고, 의심스러운 균들은 반복 실험을 하였다.

5. 역교잡 방법을 이용한 신속감수성검사

rpoB 돌연변이를 검출하기 위한 probe는 Table 1에 나타내었다. 돌연변이 검출을 위한 probe는 *rpoB* 유전자의 핵심부위 81bp (codons 507–533) 부위에서 정상적인 염기서열과 돌연변이 염기서열을 바탕으로 합성하였다.

여러 유전자 돌연변이 검출을 위한 역교잡반응은 Kox 등의 방법을 적용하였다⁹. 간단히 서술하면, probe 들은 dTTP로 tailing하여 나일론막 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)에 고착시키고 cross blotter 기구(Accutran-Cross ACC 100/0; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)를 이용하여 중합효소연쇄반응 산물을 역교잡으로 반응시켰다. Probe와 교잡된 중합효소 연쇄반응 산물은 strept-avidin-alkaline phosphatase를 처리한 다음 NBT/

Table 1. Probes for detection of mutation in *rpoB* gene

| Probes | Oligonucleotides | Remark |
|--------|-----------------------------|---|
| RM1 | 5' agccagctgagccaattcat 3' | Wild sequences from codon 509 to 515 |
| RM11 | 5' agccagccgagccaattcat 3' | Point mutation from Leu to Pro at codon 511 |
| RM12 | 5' agccagctgagccattcat 3' | Point mutation from Gln to Leu at codon 513 |
| RM13 | 5' agccagctgagccaattcat 3' | Point mutation from Ser to Arg at codon 512 |
| RM14 | 5' agccagctgagccaattcat 3' | Point mutation from Gln to Lys at codon 513 |
| RM15 | 5' agccagctgagccaattcat 3' | Point mutation from Gln to Pro at codon 513 |
| RM16 | 5' agccagctgagccaattcat 3' | Point mutation from Gln to Glu at codon 513 |
| RM2 | 5' ttcatggaccagaacaaccog 3' | Wild sequences from codon 514 to 520 |
| RM21 | 5' ttcatggtcagaacaaccog 3' | Point mutation from Asp to Val at codon 516 |
| RM22 | 5' ttcatgtaccagaacaaccog 3' | Point mutation from Asp to Tyr at codon 516 |
| RM23 | 5' ttcatggccagaacaaccog 3' | Point mutation from Asp to Ala at codon 516 |
| RM24 | 5' ttcatggccagaacaaccog 3' | Point mutation from Asp to Gly at codon 516 |
| RM3 | 5' ccgctgtcggggtgacc 3' | Wild sequences from codon 520 to 525 |
| RM3 | 5' ccgctgtcggggtgacc 3' | Point mutation from Ser to Leu at codon 522 |
| RM4 | 5' ttgaccacaagcgcoga 3' | Wild sequences from codon 524 to 530 |
| RM41 | 5' ttgaactacaagcgcogact 3' | Point mutation from His to Tyr at codon 526 |
| RM42 | 5' ttgaccgacaagcgcogact 3' | Point mutation from His to Asp at codon 526 |
| RM43 | 5' ttgaccaacaagcgcoga 3' | Point mutation from His to Asn at codon 526 |
| RM44 | 5' ttgacccccaagcgcoga 3' | Point mutation from His to Pro at codon 526 |
| RM45 | 5' ttgaccogcaagcgcoga 3' | Point mutation from His to Arg at codon 526 |
| RM46 | 5' ttgaccctcaagcgcoga 3' | Point mutation from His to Leu at codon 526 |
| RM47 | 5' ttgaactccaagcgcoga 3' | Point mutation from His to Ser at codon 526 |
| RM48 | 5' ttgaactccaagcgcoga 3' | Point mutation from His to Cys at codon 526 |
| RM5 | 5' ctgtcggcgtggggc 3' | Wild sequences from codon 530 to 535 |
| RM51 | 5' ctgttggcgtggggc 3' | Point mutation from Ser to Leu at codon 531 |
| RM52 | 5' togggcogggggcogcc 3' | Point mutation from Leu to Pro at codon 533 |
| RM53 | 5' ctgcaggcgtggggc 3' | Point mutation from Ser to Gln at codon 531 |
| RM54 | 5' ctgtcggcgtggggc 3' | Point mutation from Ser to Trp at codon 531 |
| RM55 | 5' ctgtcggcgtggggc 3' | Point mutation from Ser to Ser at codon 531 |
| RM6 | 5' acccacaagcgcogactg 3' | Wild sequences from codon 525 to 530 |
| RM61 | 5' acccacaagcgcogactg 3' | Point mutation from Leu to Pro at codon 529 |

BCIP 기질로 발색시켰다.

결 과

1. 리팜핀과 리파부틴의 교차내성

처음 시험에 사용된 리팜핀 내성균 208주 중에서 7균주는 발육 불량으로 제외하였으며, 최종 결과에 사용된 균주는 201주 이었다. 리파부틴 내성과 감수성의 판정 기준은 리팜핀과 같이 20 µg/ml 이상에서 자란 균을 내성으로 판정하였을 때, 201개 균주 중에서 41주(20.4%)가 리파부틴 농도 함유 배지에서는 자라지 않아 리파부틴 감수성으로 판정하였다 (95% 신뢰구간: 14.8% to 26.0%). 한편, 리팜핀 억제함유농도 40 µg/ml까지만 자란 균은 10주가 있었는데 이들 모두가 리파부틴 함유 배지에서는 자라지 않았다. 리팜핀 억제함유 농도 80µg/ml까지 자란균주는 모두 191주 있었는데 리파부틴 함유 배지에서 자라지 않은 균주는 31주, 20µg/ml까지 자란균주는 8주이었다(Table 2).

감수성균 50주는 모두 대조배지에서만 자라고 두 가지 약제가 각각 함유된 배지에서는 자라지 않았다.

2. *rpoB* 유전자 돌연변이별 리파부틴 내성 여부

리팜핀 내성균 201균주 중에서 *rpoB* 유전자 81bp 부위에 돌연변이가 발견된 균주는 195균주로 97.0%로 나타났다. *rpoB* 유전자 위치별로는 codon 513 위치에 돌연변이 균주가 7균주 (3.5%) 이었다. 그 중에서 Gln513Lys 돌연변이는 3균주 이었는데 모두 리파부틴 내성을 나타내었지만, Gln513Pro 돌연변이 3균주 중 2균주는 리파부틴 내성이었는데 이들은 리파부

틴 20µg/ml에서는 자랐으나 40µg/ml 이상에서는 자라지 않았다. 나머지 1균주와 Gln513Glu 1균주는 리파부틴에 감수성을 보였다.

516번 돌연변이는 25균주(12.4%) 이었다. Asp516Ala 돌연변이를 나타낸 2균주중 한 균주는 리파부틴에 내성 나타내었는데, 이 균주는 리파부틴 20 µg/ml에서는 자랐으나, 40 µg/ml 이상에서는 자라지 않았다. Asp516Ala 돌연변이 중 다른 한 균주는 Leu511Pro 돌연변이를 동시에 가지고 있었는데 이 균주는 리파부틴에 감수성이었다. Asp516Gly 돌연변이는 3주 있었는데 이들은 모두 리파부틴에 감수성을 나타내었다. Asp516Val 돌연변이는 13균주가 있었는데 그중 11주 (84.6%)는 리파부틴 감수성이었는데, 2균주는 리파부틴 내성을 나타내었다. Asp516Tyr 돌연변이는 7균주 이었는데 이 중 한 균주는 리파부틴 20µg/ml 농도에서 자라서 내성을 보였으나, 나머지 6균주는 리파부틴에 감수성을 나타내었다.

Ser522Leu 돌연변이는 3균주(1.5%)이었는데 그 중 2균주는 리파부틴에 감수성을 보였지만 1균주는 리파부틴 내성을 나타내었다.

526번 돌연변이는 42균주(20.9%)이었다. 이 중에서 His526Asn 돌연변이는 2균주가 있었는데 그 중 1균주는 리파부틴 감수성이었고, 다른 1균주는 리파부틴 내성을 보였다. 이 두 균주 중 한 균주는 Leu533Pro 돌연변이를 동시에 가지고 있었다. Leu533Pro 돌연변이는 그 자체로는 리파부틴에 감수성이었으므로 His526Asn 돌연변이는 리파부틴에 내성일 것으로 추정된다.

His526Pro 돌연변이를 가진 2균주, His526Arg 돌연변이를 나타낸 3균주, His526Asp를 나타낸 13균주, His526Tyr 돌연변이를 나타낸 14균주, His526Ser 돌

Table 2. Distribution of rifampin resistant strains depend on rifabutin concentration

| | | Rifabutin | | | | Total |
|----------|---------|-----------|---------|---------|---------|-------|
| | | 0µg/ml | 20µg/ml | 40µg/ml | 80µg/ml | |
| Rifampin | 40µg/ml | 10 | | | | 10 |
| | 80µg/ml | 31 | 8 | 63 | 89 | 191 |
| Total | | 41 | 8 | 63 | 89 | 201 |

The strains grown on LJ containing over 40µg/ml of rifampin, while over 20µg/ml of rifabutin, were regarded as resistant strains in this study.

연변이 1균주 등은 모두 리파부틴 내성을 나타내었다. 그런데 His526Leu 돌연변이를 나타낸 5균주와 His526Cys 돌연변이를 나타낸 2균주는 리파부틴 감수성을 보였다. Arg529Pro 돌연변이를 보인 1균주 (0.5%)는 리파부틴 감수성을 나타내었다.

531번에서 돌연변이를 보인 균주는 113균주(56.2%)로 가장 많이 돌연변이가 발생한 부위이었다. 그 중에서도 Ser531Leu가 109균주이었는데, 107균주는 리파부틴 내성을 나타내었는데, 2균주는 리파부틴에 감수성을 나타내었다. Ser531Trp 돌연변이는 2균주가 있었는데 모두 리파부틴에 내성을 보였다. 그 중 한 균주는 Ser512Arg 돌연변이를 동시에 가지고 있었다.

533번에 돌연변이가 있는 균주는 5균주 (2.5%)가 있었는데, 모두 다 Leu533Pro 돌연변이였으며, 그 중

한 균주는 526번 돌연변이를 동시에 가지고 있었다. 533번에서만 돌연변이를 가진 4균주는 모두 리파부틴 감수성을 나타내어 그 자체로는 리파부틴 감수성임을 알 수 있었다. Leu511Pro 돌연변이는 4균주 (2.0%)가 있었고, 이중 516번 돌연변이를 동시에 가지고 있는 3균주는 모두 리파부틴 감수성이므로 511번 돌연변이가 자체는 감수성임을 알 수 있었다. 그러나 한 균주는 His526Ser 돌연변이를 동시에 가지고 있었으며 리파부틴 내성을 나타내었다.

rpoB 유전자의 81bp 내에서 돌연변이를 일으키지 않은 균주는 모두 6균주 (3.0%)이었는데, 그 중에서 5균주는 리파부틴 내성이었으며 1균주는 리파부틴 감수성을 나타내었다 (Table 3). 리팜핀 감수성균은 모두 *rpoB* 유전자의 81bp내에서 돌연변이는 없었다.

Table 3. Rifabutin resistance profile of 201 rifampin resistant strains depend on mutation in *rpoB* gene

| Codon site of <i>rpoB</i> gene | Mutation type | Amino acid changes | No. of Strains | Rifabutin | |
|--------------------------------|---------------|--------------------|----------------|-------------|-------------|
| | | | | Resistant | Susceptible |
| 513 | CAA→AAA | Gln → Lys | 3 | 3 | |
| | CCA | Gln → Pro | 3 | 2 | 1 |
| | GAA | Gln → Glu | 1 | | 1 |
| 516 | GAC→GCC | Asp → Ala | 1 | 1 | |
| | GAC→GCC | Asp → Ala | 1 | | 1 |
| 516,511 | CTG→CCG | Leu → Pro | 1 | | 1 |
| | GAC→GGC | Asp → Gly | 1 | | 1 |
| 516,511 | GAC→GGC | Asp → Gly | 2 | | 2 |
| | CTG→CCG | Leu → Pro | 2 | | 2 |
| 516 | GAC→GTC | Asp → Val | 13 | 2 | 11 |
| | TAC | Asp → Tyr | 7 | 1 | 6 |
| 522 | TCG→TTG | Ser → Leu | 3 | 1 | 2 |
| 526 | CAC→AAC | His → Asn | 1 | | 1 |
| 526,533 | CAC→AAC | His → Asn | 1 | 1 | |
| | CTG→CCG | Leu → Pro | 1 | | |
| 526 | CAC→CCC | His → Pro | 2 | 2 | |
| | CGC | His → Arg | 3 | 3 | |
| | CTC | His → Leu | 5 | | 5 |
| | GAC | His → Asp | 13 | 13 | |
| | TAC | His → Tyr | 14 | 14 | |
| 526, 511 | CAC→TCC | His → Ser | 1 | 1 | |
| | CTG→CCG | Leu → Pro | 1 | | |
| 526 | CAC→TGC | His → Cys | 2 | | 2 |
| 529 | CGA→CCA | Arg → Pro | 1 | | 1 |
| 531 | TCG→CAG | Ser → Gln | 2 | 2 | |
| | TGG | Ser → Trp | 1 | 1 | |
| 531, 512 | TCG→TGG | Ser → Trp | 1 | 1 | |
| | AGC→CGC | Ser → Arg | 1 | | |
| 531 | TTG | Ser → Leu | 109 | 107 | 2 |
| 533 | CTG→CCG | Leu → Pro | 4 | | 4 |
| none | | | 6 | 5 | 1 |
| Total | | | 201 (100.0%) | 160 (79.6%) | 41 (20.4%) |

3. 역교잡 반응을 이용한 돌연변이 검출

rpoB 유전자내에서 돌연변이를 일으킨 경우 모두 표1과 같이 probe로 만들어 역교잡 반응을 한 결과 모두 돌연변이를 일으킨 균주를 찾을 수 있었다. 리팜핀 내성인 201균주 중에서 6균주는 *rpoB* 유전자내에 돌연변이가 없었으므로 돌연변이를 가진 195균주만을 대상으로 해서 비교하였을 경우 일반약제 감수성검사서 리파부틴 감수성 균주는 40균주 이었고, 내성 균주는 155균주 이었다.

Leu511Pro, Ser512Arg, Gln513Glu, Asp516Ala, Asp516Gly, Asp516Val, Asp516Tyr, Ser522Leu, His526Asn, His526Leu, His526Cys, Arg529Pro, Leu533Pro 돌연변이 등을 리파부틴 감수성을 의미하는 돌연변이로 판단한다면, 43개 균주가 감수성으로 되었다. 그러나 이 중에서 37균주가 리파부틴 20 µg/ml에서도 자라지 않은 감수성 균이었다. 그러므로 이 방법의 민감도는 92.5%이었다 (표 4). 한편 역교잡 방법을 사용했을 경우 감수성으로 판정한 나머지 probe 즉, Gln513Lys, Gln513Pro, His526Pro, His526Arg, His526Asp, His526Tyr, His526Ser, Ser531Gln, Ser531-Trp, Ser531Leu 돌연변이를 리파부틴 내성을 주는 probe로 간주할 때, 내성으로 나타난 균주는 152균주 이었고 이 중에서 149균주만이 리파부틴 20 µg/ml 이상에서 자란 내성균이 되므로 특이도는 96.1%이었다 (Table 4).

고 찰

리팜핀은 결핵치료에 있어 가장 강력한 살균력 있는 항결핵약제로 사용되고 있다. 그 이유는 리팜핀은 대식세포 내에서 잠복기에 가까운 결핵균에 뿐만 아

니라 세포밖에 있는 균에도 살균 작용하기 때문이다. 일반적으로 다제 내성균이 되는 과정에서, 일반적으로 아이소니아지드 내성이 리팜핀 내성 보다 먼저 발생되는데¹⁰, 이로 인해 리팜핀 내성균은 곧 다제 내성균을 의미하는 지표로도 사용 된다¹¹. 다제 내성 결핵환자의 치료는 2차 항결핵 약제 치료로 들어가게 되면, 상대적으로 치료 효과가 떨어지는 항결핵약제를 오랫동안 투약하여야 하는 어려움이 있기 때문에 항균력이 뛰어나고 치료 기간을 단축시킬 수 있는 새로운 항생제의 개발이 필요한 상황이다. 이러한 이유로 리팜핀과 거의 동일한 항균력을 나타내는 리파부틴의 사용은 다제 내성 결핵 환자의 치료에서 기간 단축 및 치료 효과 향상에 매우 중요한 역할을 할 수 있다. 1996년도 Grassi의 연구 결과 발표에 따르면 270명의 다제 내성 결핵환자에게 리파부틴을 포함한 병합요법을 하였을 때, 대부분의 환자에서 증상이 호전되었고, 약 34% 이상의 환자에서는 균 음전이 되었다¹². 그러나 아직까지 우리나라에서는 다제 내성 결핵환자에서 리파부틴 감수성 약제를 포함한 치료의 효과에 대한 보고가 없으며, 이는 우리나라 환자들에서 분리된 리팜핀 내성 결핵균과 리파부틴의 교차내성 정도에 대한 연구가 시행되지 않았으며 또한 리파부틴 약제 감수성 검사가 임상 의사들에게 제공되지 않은 것에 기인하였을 것이다. 따라서 본 연구는 리팜핀 내성균이지만 같은 Rifamycin 계열의 항결핵제 중의 하나인 리파부틴과의 교차내성 정도와 리파부틴 감수성인 결핵균의 유전자적인 특성을 파악하여, 다제 내성 결핵 환자의 일부라도 리파부틴을 처방하는데 도움을 주고자 하였다.

결핵연구원에서 수집된 리팜핀 내성 결핵균 201균주 중에서 일반적인 약제감수성검사를 실시한 결과 41균주 (20.4%)가 리파부틴 감수성으로 나타났다. 이

Table 4. Detection of Rifabutin-susceptible isolates by genotype method using reverse hybridization technique among 195 *M. tuberculosis* isolates with *rpoB* mutation

| Genotype method | | Conventional method | | Total |
|-----------------|-------------|---------------------|-----------|-------|
| | | Susceptible | Resistant | |
| Susceptible | Susceptible | 37 | 6 | 43 |
| | Resistant | 3 | 149 | 152 |
| Total | | 40 | 155 | 195 |

수치는 1987년 Dickinson이 리팜핀 내성균 35균주로 실험한 결과 11균주가 리파부틴 감수성이었던 결과(31%)보다는 낮은 수치이다¹³. 그러나 1998년 Yang의 실험 결과에서는 리팜핀 내성인 93균주 중에서 17균주(18.3%)가 리파부틴에 감수성을 나타내었는데, 이 비율 보다는 본 실험 결과가 다소 높게 나타났다¹⁴. *rpoB* 유전자 위치별로는 codon 513 위치에 돌연변이균주가 7균주(3.5%) 이었는데, 이는 Telenti의 실험 결과(3%)와 비슷하였다¹. 그 중에서 Gln513Lys 돌연변이는 3균주 이었는데 모두 리파부틴 내성을 나타내었는데, 이러한 결과는 Yang의 실험결과와 일치하였다¹⁴. Yang의 실험에서는 Gln513Leu(CTA) 돌연변이도 리파부틴에 내성을 나타내었다¹⁴. 본 실험에서는 Gln513Pro 돌연변이 3균주 중 2균주가 리파부틴에 내성이었는데, 이는 타 보고에서도 내성으로 나타났다^{15,16}. 516번 돌연변이는 25균주(12.4%) 이었다. 이 비율은 Yuen의 결과(10%)와 비슷하였다¹⁷. Asp516Val 돌연변이는 13균주가 이었는데 그중 11주(84.6%)는 리파부틴 감수성이었는데, 2균주는 리파부틴 내성을 나타내었다. Asp516Val 돌연변이는 다른 보고에서는 감수성으로 나타났다^{14,15,16,18}. 이 돌연변이 자체는 리파부틴에 감수성임을 알 수 있으나, 리파부틴에 내성을 보인 균주가 발견된 것은 리파부틴에 내성을 줄 수 있는 다른 기작이나 요인이 존재할 수 있음을 의미한다.

Asp516Tyr 돌연변이는 7균주 이었는데 그 중 6균주가 리파부틴 감수성을 나타내었는데, 이 돌연변이는 타 보고에서 리파부틴 감수성으로 나타났다^{16,18}. Ser522Leu 돌연변이는 3균주(1.5%)이었는데 그 중 2균주는 리파부틴에 감수성을 보였지만 1균주는 리파부틴 내성을 나타내었는데, 타 보고에서는 이 돌연변이는 리파부틴에 감수성을 나타냈다^{15,18}. Cavusoglu의 결과에서는 Ser522Trp 돌연변이를 발견하였는데 이는 리파부틴에 내성을 나타내었다¹⁶.

526번 돌연변이는 42균주(20.9%)이었는데, 이 비율은 Telenti의 결과인 28% 및 Yuen의 결과인 32% 보다는 낮았다^{1,17}. His526Asn 돌연변이는 2균주 이었는데 그 중 1균주는 리파부틴 감수성이었고, 다른 1균주는 리파부틴 내성을 보였다. Moghazeh의 실험결과¹⁹

에서 His526Asn 돌연변이를 가진 균주는 KRM-1648에서도 내성을 나타낸 것을 비추어 볼 때, 이 돌연변이 자체는 리파부틴에 내성을 가질 것으로 판단된다. 그러나 리파부틴에 감수성을 줄 수 있는 다른 이유가 있을 것으로 본다. His526Pro 돌연변이, His526Arg 돌연변이, His526Asp 돌연변이, His526Tyr 돌연변이를 가진 균주는 모두 리파부틴에 내성을 나타냈는데, 이러한 결과는 타 보고와 일치하였다^{15,16,18}. His526Leu 돌연변이는 리파부틴 감수성을 나타냈는데 이는 Yang의 결과와 일치하였다¹⁴. Yang의 결과에 따르면 His526Gly와 His526Gln도 리파부틴 감수성을 보이므로¹⁴ codon 526의 돌연변이에는 리파부틴 감수성균도 존재함을 알 수 있다. Arg529Pro 돌연변이를 보인 균주는 리파부틴 감수성을 나타냈는데, Yang의 결과¹⁴에서는 Arg529Lys 돌연변이가 리파부틴에 감수성이었음을 볼 때, codon 529 돌연변이는 리파부틴에 감수성을 준다고 판단된다.

531번에서 돌연변이를 보인 균주는 113균주(56.2%)로 가장 많이 돌연변이가 발생한 부위이었다. 이 비율은 Telenti 결과 51.5% 및 Yuen의 결과 52% 보다 높은 편이었다^{1,17}. 그 중에서도 Ser531Leu가 109균주이었는데, 그 중 107균주는 리파부틴 내성을 나타내었는데, 2균주(1.8%)는 리파부틴 감수성을 나타내었는데, Yang의 결과에서도 Ser531Leu 돌연변이 56균주 중 1균주(1.7%)가 리파부틴에 감수성을 나타내었다¹⁴. Cavusoglu의 보고에서는 Ser531Leu 돌연변이를 나타낸 19개 균주중에서 3균주(15.8%)는 리파부틴 감수성을 보였다¹⁶. Ser531Trp 돌연변이는 모두 리파부틴에 내성을 보였는데, 이는 타 보고서와 일치하였다^{16,18}. Leu533Pro 돌연변이를 가진 4균주는 모두 리파부틴 감수성을 나타내어 그 자체로는 리파부틴 감수성임을 알 수 있었는데, 이는 타 보고와도 일치한다^{14,16}. 그러나 Williams의 결과에서는 리파부틴 내성을 가진Leu533Pro 돌연변이 1균주를 발견하였다¹⁵. Leu511Pro 돌연변이는 4균주가 있었고, 이중 516번 돌연변이를 동시에 가지고 있는 3균주는 모두 리파부틴 감수성이므로 511번 돌연변이 자체는 감수성임을 알 수 있었다. 이는 타 보고와도 일치하였다^{15,18}. Ser512Arg 돌연변이를 가진 균주가 1균주 있었지만

Ser531Trp 돌연변이를 동시에 가지고 있어 리파부틴에 내성을 나타내었다. Ser512Arg 돌연변이는 처음 보고이며, Moghazeh 결과¹⁹에 따르면 Ser512Thr 돌연변이가 KRM-1648에 감수성인 것을 비추어 볼때, codon 512돌연변이는 리파부틴에 감수성일 가능성이 큰 것으로 본다. *rpoB* 유전자의 81bp 내에서 돌연변이를 일으키지 않은 균주는 모두 6균주 이었는데, 그 중에서 5균주는 리파부틴 내성이었으며 1균주는 리파부틴 감수성을 나타내었는데, Yang의 결과에서도 리팜핀 내성이면서 *rpoB* 유전자 81bp내 돌연변이가 없는 4균주 중 2균주는 리파부틴 감수성이었고, 2균주는 리파부틴 내성을 보였다¹⁴. 본 연구를 통하여 Gln513Glu, Asp515Gly, His526Cys, Arg529Pro 돌연변이가 리파부틴에 감수성이라는 사실은 본 연구에서 처음으로 밝혀졌다.

본 연구에서는 리파부틴 내성 기준을 20 µg/ml로 정하였는데, 20 µg/ml까지만 자란 8균주의 돌연변이를 보면, Gln513Pro에서 2균주, Asp516Ala에서 1균주, Asp516Tyr에서 1균주, Ser531Leu에서 3균주, 돌연변이가 없는 균주가 1균주가 있었다. 이 중에서 돌연변이가 없는 경우와 Ser531Leu 돌연변이는 내성인 균이 많았으므로 20 µg/ml에서 자란 균을 리파부틴 내성으로 판정하는 것은 무리가 없어 보이나, Gln513Pro, Asp516Ala, Asp516Tyr 돌연변이는 감수성 균도 있었다. 특히 Asp516Tyr 돌연변이를 나타낸 7균주 중에서 6균주가 모두 감수성을 나타내었다는 것은 20 µg/ml이 리파부틴 내성 판정기준으로서 매우 엄격하였다고 사료된다. 따라서 이러한 부분은 차후에 좀 더 보강하여 보다 정확한 최소억제농도(MIC)를 결정할 필요가 있다.

한편, 대부분 균주에서 리파부틴 내성을 나타내는 돌연변이 형태 중에서 감수성 균주도 있었으며, 반대로 대부분 균주에서 리파부틴 감수성을 보인 돌연변이 형태에서 리파부틴 내성을 보인 균주도 있었다. 이는 아직 밝혀지지 않은 내성 기작이 존재한다는 것을 의미하며, 또는 미생물학적 특성상 특수한 조건에서 내성이 감수성으로 표현될 수도 있음을 암시한다. 따라서 이러한 규명을 위해서는 앞으로 좀 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 이러한 점은 역교잡 방법

으로 리파부틴 감수성 여부를 판정하는 데 있어 한계점으로 인식되고 있다.

결론적으로 우리나라의 리팜피신 내성 4-5 균주 중에서도 1 균주는 리파부틴에 감수성을 보이고 있어 다제내성 결핵 환자에서 리파부틴 약제의 사용을 고려할 가치는 충분하다고 본다. 따라서 과거 치료력이 있는 환자들이나 다제 내성 환자와의 접촉력이 있어 다제 내성 결핵이 의심되는 환자들을 대상으로 한 리파부틴 약제의 내성 검사는 임상 의사들에게 유용할 것으로 판단된다. 유전자를 이용한 리파부틴 감수성 검사는 내성과 감수성을 더욱 명확하게 구분할 수 있기 위해서 추가 연구 및 좀 더 많은 자료의 축적이 요구된다. 아울러 추후에 다제 내성 결핵의 리파부틴 치료의 효과에 대한 임상적 연구가 필요하다고 본다.

요 약

연구 배경 :

리팜핀 내성 균주에서 리파부틴 약제의 교차 내성 정도와 리팜핀 내성-리파부틴 감수성 결핵균의 *rpoB* 유전자 돌연변이의 특성을 알아보고자 연구를 실시하였다.

연구 방법 :

감수성검사서 리팜핀에 내성인 균주를 선정하여 리파부틴 농도 0-80µg/ml 농도로 재접종하여 감수성 여부를 확인하였다. 리팜핀-내성균주 모두 염기서열 분석을 통하여 리파부틴 감수성과의 관계를 조사하였다. 역교잡 방법으로 리파부틴 감수성균을 구별하였다.

연구 결과 :

우리나라에서 분리된 리팜핀 내성인 201균주 중에서 41균주(20.4%)는 리파부틴에 감수성을 보였다. 리파부틴 감수성을 보이는 *rpoB* 유전자 돌연변이는 Leu511Pro, Ser512Arg, Gln513Glu, Asp516Ala, Asp516Gly, Asp516Val, Asp516Tyr, Ser522Leu, His526Asn, His526Leu, His526Cys, Arg529Pro, Leu533Pro 등 이었다. 역교잡 방법을 이용하였을 경우 *rpoB* 돌연변이를 가진 균주 중에서 리파부틴 감수성균의 민감도는 92.5%이었고, 특이도는 96.1%이었다.

결 론 :

리팜핀 내성균이라도 약 20.4% (95% 신뢰구간: 14.8% to 26.0%)가 리파부틴 약제에 감수성이므로, 우리나라의 다제내성 결핵환자의 치료에서도 리파부틴이 중요한 약제로서 역할을 할 수 있음이 밝혀졌다. 향후 다제내성 결핵 환자에서의 리파부틴의 치료 효과에 대한 임상적 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole ST, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341:647-50.
2. Michison DA, Nunn AJ. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:423-30.
3. McGregor MM, Olliaro P, Wolmarans L, Mabuza B, Bredell M, Felten MK, et al. Efficacy and safety of rifabutin in the treatment of patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1462-7.
4. Telenti A. Genetics of drug resistance in tuberculosis. In: Iseman MD, Huitt GA, editors. *Clinics in chest medicine*. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 55-64.
5. Dickinson JM, Mitchison DA. In vitro activity of new rifamycins against rifampicin-resistant *M. tuberculosis* and MAIS-complex mycobacteria. *Tubercle* 1987; 68:177-82.
6. Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council. A controlled study of rifabutin and an uncontrolled study of ofloxacin in the retreatment of patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid, streptomycin and rifampicin. *Tuberc Lung Dis* 1992;73:59-67.
7. Blumberg HM, Buman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/ Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167: 603-62.
8. Kim SJ, Bai GH, Hong YP. Drug resistant tuberculosis in Korea, 1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:302-8.
9. Kox LF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM, Kolk AH. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995;33:3225-33.
10. Nolan CM, Williams DL, Cave MD, Eisenach KD, el-Hajj H, Hooton TM, et al. Evolution of rifampin resistance in human immunodeficiency virus-associated tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152: 1067-71.
11. Goble M, Iseman D, Madsen LA, Watite D, Ackerson L, Horsburgh CR Jr. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med* 1993;328:527-32.
12. Grassi C, Peona V. Use of rifabutin in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1996;22 (Suppl 1):S50-4.
13. Dickinson JM, Mitchison DA. In vitro activity of new rifamycin against rifampicin-resistant *M. tuberculosis* and MAIS-complex mycobacteria. *Tubercle* 1987; 68:177-82.
14. Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirakata Y, et al. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:621-8.
15. Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PR, et al. Contribution of *rpoB* mutation to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1853-7.
16. Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgic A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:662-5.
17. Yuen LK, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol* 1999;37:3844-50.
18. Bodmer T, Zurcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:345-8.
19. Moghazeh SL, Pan X, Arain T, Stover CK, Musser JM, Kreiswirth BN. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2655-7.