

Pyrosequencing 분석법을 이용한 Rifampicin과 Isoniazid 결핵약제내성의 빠른 검사법

건국대학교병원 병리과

오서영·김호빈·신민식·김진욱·박성휘

Pyrosequencing Based Detection of Rifampicin or Isoniazid Resistant in *Mycobacterium tuberculosis*

Seo-Young Oh, Hyo-Bin Kim, Min-Sik Shin, Jin-Wook Kim and Sung-Hwuy Park.

Department of pathology, Konkuk University Medical Center, Seoul 143-729, Korea

Rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) are the most important drug for the treatment of *Mycobacterium tuberculosis*. Mutations correlated to rifampicin and isoniazid-resistance have been detected in *rpoB* gene and *katG* gene, respectively. Of the rifampicin-resistant isolates, 90% showed mutations in *rpoB* gene at codon 507 to 533. Isoniazid-resistant isolates analysed had a mutation in *katG* at codon 315. The aim of this study is to develop a pyrosequencing-based approach for rapid detection of rifampicin or isoniazid resistant *M. tuberculosis* based on characterization of all possible mutation in the target region. For this study, the DNA selected from 35 cases of MTB PCR positive clinical sample such as bronchial washing, sputum, and pleural fluid. RIF or INH resistant was analyzed by pyrosequencing data of *rpoB* and *katG* gene. 28 (80%) and 7 (20%) of 35 MTB PCR positive DNAs were occurred rifampicin-sensitivity and resistant, respectively. For INH, 30 (85.7%) and 5 (14.5%) cases were detected isoniazid-sensitivity and resistant, respectively. When pyrosequencing analysis was compared with ABI sequencing analysis, both analysis were presented same result, but pyrosequencing analysis was more rapid than ABI sequencing analysis. In conclusion, we found that pyrosequencing technology offers high accuracy, specificity, short turn around time and a high throughput in detection of rifampicin or isoniazid resistance in *M. tuberculosis*.

Key Words : *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampicin-resistant, Isoniazid-resistant, Pyrosequencing

I. 서 론

결핵 치료의 기본은 항 결핵제를 사용하는 화학요법이

다. 결핵 치료에는 rifampicin(RIF), isoniazid(INH) 같은 약제와 다른 약제를 병행하여 사용하고 있다(Cohn 등, 2004). 하지만 최근 일부 결핵균종은 이들 약제에 내성을 보여 문제가 되고 있다. 이를 다제내성 결핵균(MDR-TB, multi-drug resistant *M. tuberculosis*)이라 한다(Zhang 등, 1992; Ramaswamy와 Musser, 1998; 대한결핵 및 호흡기 학회, 2005).

교신저자 : 오서영, (우)143-729, 건국대학교병원 병리과.
TEL : 02-2030-5631, 010-4610-2926
E-Mail : syoh@kuh.ac.kr

Table 1. The information of changed nucleotide in *rpoB* gene and *katG* gene

<i>rpoB</i> gene		<i>katG</i> gene	
Codon	Mutation	Codon	Mutation
516	GAC(WT*) → GTC		
517	CAG(WT) → CAC		
526	CAC(WT) → AAC, CGC, GAC, TAC, TCC, CTC	315	AGC(WT) → ACC AAC
531	TCG(WT) → TTG		
532	GCG(WT) → GTG		

*WT, wild-type.

RIF은 DNA dependent RNA polymerase β -subunit (*rpoB*)에 결합하여 전사 초과과정을 억제함으로써 항 결핵능을 보이는 약제이고(Ramaswamy와 Musser, 1998), INH은 catalase-peroxidase(*katG*)에 의해 활성화되어 여러 작용기를 만들어 세포 내의 거의 모든 대사경로를 차단하여 결핵균을 사멸하는 약제이다(Zhang 등, 1992).

RIF의 내성기전은 *rpoB* 유전자의 돌연변이로 DNA dependent RNA polymerase가 변형되어 RIF이 결합할 수 없게 되는 까닭으로 설명되고 있으며 INH는 명확한 내성 기전은 아직 밝혀지지 않았지만 *katG*, *inhA*, *kasA*, *ndh*, *ahpC* 등과 같은 유전자 돌연변이와 INH 내성이 관련있다고 알려져 있다(김, 2008). RIF 약제내성은 *rpoB* 유전자의 amino acid 507~533 region에서 90% 이상의 돌연변이가 일어나며 특히, codon 526과 codon 531에서 70%이상의 돌연변이가 일어난다고 밝혀져 있다. 그리고 INH 약제 내성은 *katG* 유전자 돌연변이가 INH 내성 *M. tuberculosis*의 50~80%에서 관찰되며 amino acid 315에서 대부분 Ser315Thr 돌연변이가 나타나고 있다(Riska 등, 2000). *rpoB* 유전자와 *katG* 유전자의 대표적인 돌연변이 양상을 Table 1에 나타내었다(Arnold 등, 2005).

결핵균 내성 검사에는 상품화된 액체배지 배양법, 고체배지 이용법, DNA sequencing, heteroduplex analysis, PCR-SSCP(single-stranded conformation polymorphism), line probe assay 그리고 mismatch analysis와 같은 다양한 방법들이 있다. 하지만 이런 방법들은 검사 비용이 많이 들 뿐만 아니라 복잡한 검사 단계와 많은 검사시간이 소요되며, DNA sequencing 외에는 단순히 정해진 돌연변이 위치와 정해진 돌연변이 형태만을 확인할 수 밖에 없는

단점이 있다고 보고되었다(Zhao 등, 2005).

최근 결핵관리 지침서(2005)에는 약제 내성 환자들이 늘어 결핵 약제 치료시 초기에 약제 내성 검사를 실시하여 효과적인 결핵 약제를 사용함으로써 조기에 치료하는 것이 좋다고 밝혔고, Krüüner 등(2002)은 빠른 결핵약제 내성여부를 확인할 수 있는 분자생물학적인 검사방법을 개발이 필요하다고 보고하였다.

본 연구를 위한 pyrosequencing 법은 20~70 bps정도의 짧은 서열을 빠른 방법으로 정확하게 서열을 분석 할 수 있다는 장점을 이용하여, RIF과 INH 결핵 약제의 내성에 관련되는 돌연변이 여부를 빠르게 검출할 수 있는 검사 방법에 대하여 연구하였다. 또한, ABI sequencing 방법과 비교 분석하여 민감도와 정확도를 확인하였다.

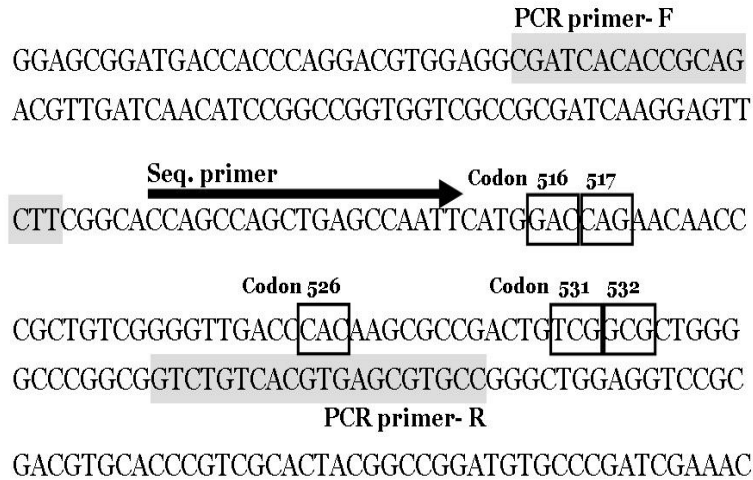
II. 재료 및 방법

1. 대상

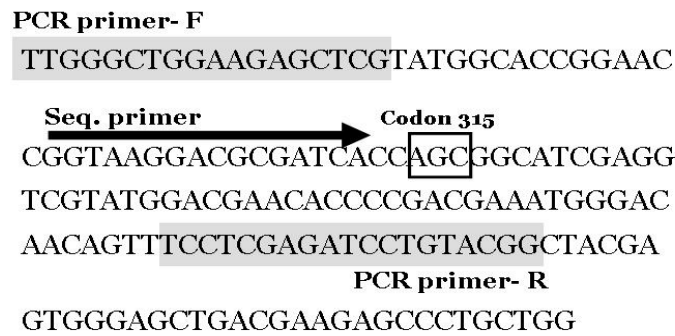
건국대학교병원 호흡기 알레르기 내과에서 의뢰한 임상검체에서 결핵균 중합효소연쇄반응(MTB-PCR)에서 양성을 보인 35 명 환자의 DNA를 이용하여 실시하였다.

2. Primer design

Rifampicin과 isoniazid 결핵약제 내성 검사를 위한 유전자 증폭과 pyrosequencing 분석에 필요한 pyrosequencing primer는 *M. tuberculosis*가 가지고 있는 *rpoB* 유전자와 *katG* 유전자의 염기서열을 찾아, pyrosequencer가 제공하는 primer design program을 이용하여 제작하였



A. *RpoB* gene



B. *KatG* gene

Fig. 1. Target sequence regions of *rpoB* gene (A) and *katG* gene (B) for rifampicin and isoniazid-resistant in *Mycobacterium tuberculosis*. Primer sequences for pyrosequencing analysis are shown in shadow or bold arrow. The major codon positions are presented in boxes.

다. *rpoB* 유전자는 180 bps로 증폭이 되고, *katG* 유전자는 130 bps로 증폭되어 지도로 제작 되었다(Fig. 1).

않도록 상층액을 뽑아낸 다음 유전자 증폭반응에 이용하였다.

3. DNA 추출

Bronchial washing, 흉수, 파라인 조직 등의 환자 검체를 전처리 한 후 10% resin이 들어 있는 DNA 추출 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20)에 200 µg/mL Proteinase K를 56°C에서 30 분 정도 처리한 다음 100°C 에서 10 분 동안 처리한다. 그리고 13000 rpm에서 10~15 분 동안 원심분리한 후, resin이 따라오지

4. 중합효소 연쇄반응

유전자 증폭을 위한 PCR 반응액은 각 0.4 pmol primer에 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 그리고 1.5 U Immolase DNA *Taq* polymerase(Bioline, London, UK)를 포함하여 총 50 µL를 유전자 증폭기에서 반응시켰다. *rpoB* gene와 *KatG* gene의 증폭을 위한 조건은 95°C에서 10 분 변성시킨 후 95°C에서 30 초, 각각 6

Table 2. Result of multi-drug resistant by pyrosequencing analysis in KUMC*

No. of strains tested	No. (%) of rifampicin		No. (%) of isoniazid	
	Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant
35	28 (80)	7 (20)	30 (85.7)	5 (14.3)

* KUMC, Konkuk University Medical Center

Table 3. Detected pattern of mutation by pyrosequencing analysis in KUMC*

<i>rpoB</i> gene		<i>katG</i> gene	
Codon	Mutation	Codon	Mutation
516	GAC(WT [†]) → GTC		
517	CAG(WT) → CAC		
526	CAC(WT) → AAC, TCC, CTC, TAC	315	AGC(WT) → ACC, AAC
531	TCG(WT) → TTG		
532	GCG(WT) → GTG		

* KUMC, Konkuk University Medical Center, [†] WT, wild-type

3℃와 58℃에서 30 초, 72℃에서 30 초 동안 50 cycles을 반응시키고 72℃에서 5 분 동안 반응시켰다. 유전자 증폭 반응이 끝나면 증폭된 증폭산물을 2% agarose에서 전기영동하여 확인하였다.

5. Pyrosequencing 분석

Pyrosequencing 분석은 SQA reagent kit(Biotage AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 시행하였고 sequencing primer는 Fig. 1에 나타내었다. Pyrosequencing 분석은 biotinylated 증폭산물 20 μL를 이용하여 96 well PCR plate에서 streptavidin-coated sepharose bead와 결합시키고 증폭 유전자가 결합된 bead를 pyrosequencing용 96 well plate에 옮긴 후 80℃에서 변성 시킨 다음 실온에서 증폭된 염기와 sequencing primer가 결합할 수 있도록 10 분 동안 반응하였다.

분석실행은 기기에 분주한 enzyme, substrate 그리고 dNTP가 증폭산물과 상보 결합하는 원리로 분석되며, pyrosequencer 기기의 작동은 제조사에서 제공한 매뉴얼을 기본으로 실행하였다.

III. 결 과

결핵균 PCR에서 양성인 검체에서 추출한 유전자 증폭 산물을 이용하여 pyrosequencer로 실시한 35 명의 결핵약제내성 검사에서 RIF 약제에 감수성을 나타낸 환자는 28 명으로 80%를 나타냈고, 내성을 나타낸 환자는 7 명으로 20%의 약제내성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 INH 내성 검사에서는 감수성을 나타낸 환자가 30 명으로 85.7%를 나타냈고, 내성을 나타낸 환자는 5 명으로 14.3%의 약제내성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Table 2).

RIF약제 내성 유전자의 돌연변이 양상을 보면 *rpoB* 유전자 codon 526은 CAC → AAC, CTC로 돌연변이가 생겼고 codon 531에서는 TCG → TTG로 나타나며, codon 532 에서는 GCG → GTG로 돌연변이가 생성되어 RIF 내성을 형성함을 알 수 있었다.

INH약제 내성 유전자 돌연변이 양상을 보면 *katG* gene codon 315에서 AGC → ACC 로 대부분이 돌연변이가 일어났고 한 명의 환자에서 AAC로 돌연변이가 발생하는 것으로 관찰되었다(Table 3).

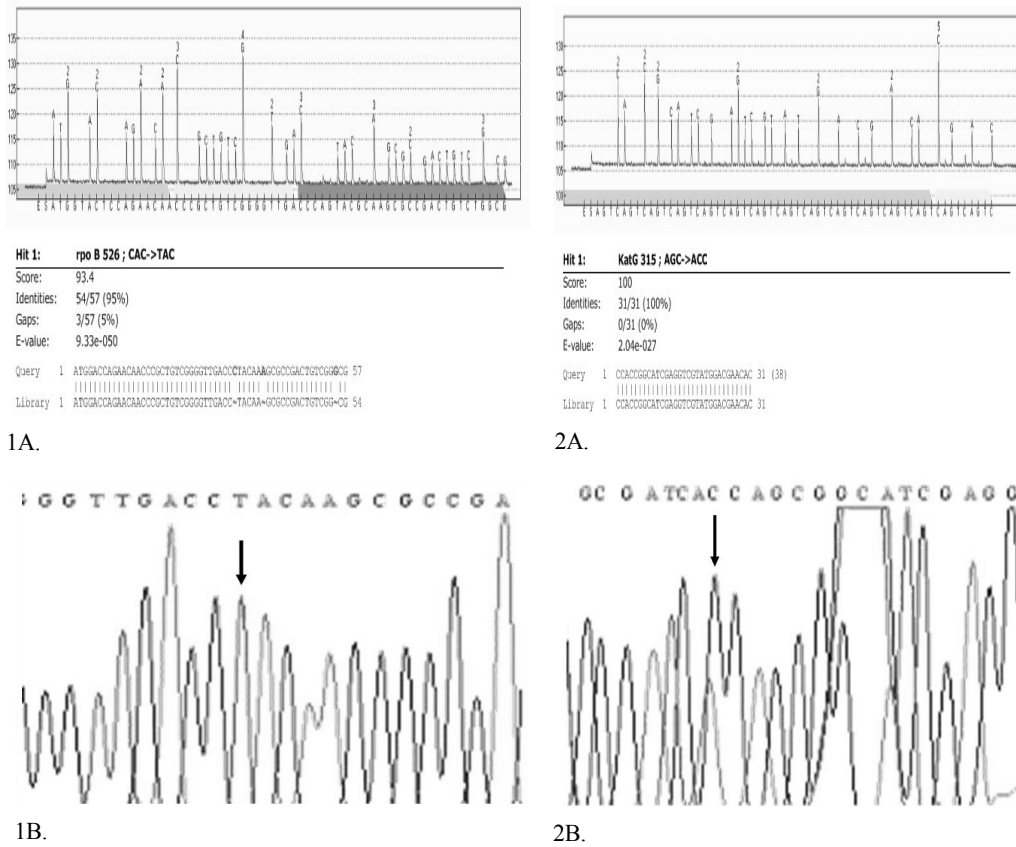


Fig. 2. Comparison of pyrosequencing analysis and ABI sequencing analysis.

- 1, For *rpoB* gene mutation between pyrosequencing (A) and ABI sequencing (B).
- 2, For *katG* gene mutation between pyrosequencing (A) and ABI sequencing (B).

Pyrosequencing 분석방법과 ABI sequencing을 비교한 결과를 보면, 대부분의 검체에서 동일한 결과를 볼 수 있었다(Fig. 2). Pyrosequencing 분석, ABI sequencing 분석, line probe assay(LiPA)의 검사방법과 소요시간을 비교해 본 결과 검체당 pyrosequencing 분석은 4시간, ABI sequencing 분석은 6시간, 그리고 line probe assay(LiPA)법은 12시간 이상 소요되는 것으로 조사 되었고, LiPA법인 경우 결핵균을 배양하여 순수한 결핵균 양이 많을 경우에 만 정확한 결과를 볼 수 있는 단점을 갖고 있었다.

IV. 고 찰

결핵관리 지침서에 따르면 결핵에 걸린 환자에게 보다

빠르고 정확한 항생제의 사용은 결핵균이 내성을 가질 수 있는 확률을 줄일 수 있다고 한다. 더욱이 결핵환자 치료에 사용되는 항생제에 대한 정확한 선택은 환자의 치료에 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있다(Cohn 등, 2004; 대한결핵 및 호흡기학회, 2005). 이런 정확한 결핵 약제 선택은 결핵균이 항생제 내성을 가지고 있는지를 빠르고 정확하게 확인 하는 것이 중요하다고 할 수 있다(Jureen 등, 2006; Krüner 등, 2002).

검사시간의 단축을 위해서 최근 분자생물학적 방법으로 유전자 증폭을 이용하여 염기의 돌연변이를 분석하는 검사방법을 선택하고 있고 이런 방법으로는 PCR-SSCP 방법과 LiPA방법을 많이 사용하고 있다. 하지만 이런 방법들은 복잡한 검사 단계와 많은 검사 소요시간이 필요로 하다는 단점과 돌연변이가 생겼어도 변화 양상을 과

악하기가 쉽지 않으며 특히, 결핵균의 양을 많이 필요로 하므로 임상검체에서 얻어진 결핵균의 양으로는 정확한 분석이 어렵다는 단점을 가지고 있었다(Sinclair 등, 2003; Ronaghi 등, 1998; Ahmadian 등, 2000; Kruckeberg와 Thibodeau, 2004).

Pyrosequencing 분석법은 유전자 증폭 후 20 bps 정도의 sequencing primer로 상보적인 염기에 정확히 결합을 한 후 60 bps의 짧은 상보적인 염기를 합성하는 방법으로 분석하므로 민감도와 정확도가 높은 분석방법이다. 그리고 이 방법은 다량의 검체를 분석하는데 1시간 이내로 분석이 가능하고 identification program을 이용하여 돌연변이가 일어나는 위치와 변화된 염기를 한번에 볼 수 있는 편리하고 빠른 방법이었다. 그리고 pyrosequencing 분석 방법은 ABI sequencing 방법으로 비교분석 했을 때 비슷한 결과를 얻을 수 있는 것으로 확인할 수 있었고 민감도 또한 높다고 확인되었다.

결론적으로, 결핵약제내성 검사에서 pyrosequencing 분석법은 정확도, 분석시간의 효율성이 있고, 환자의 검체로부터 직접 얻은 DNA를 이용하여 분석이 가능하므로 배양으로 인한 검사 시간을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있었다. 그리고 pyrosequencing 분석법을 이용한 빠르고 신속한 검사는 결핵환자에게 투여할 약제의 선택이 용이해지고 보다 정확하고 신속한 항생제 치료를 적용함으로써 결핵환자에게는 항생제에 대한 고통을 덜어주고 항생제 과잉처방을 줄일 수 있는 계기가 될 것으로 기대되고 있다.

참 고 문 헌

- Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M, Lundeberg J.. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 280:103-110, 2000.
- Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. *Clin Microbiol Infect* 11:122-130, 2005.
- 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. *Clin Infect Dis* 24(suppl.1):S121-S130, 2004.
- Jureen P, Engstrand L, Eriksson S, Alderborn A, Krabbe M, Hoffner SE. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Pyrosequencing technology. *J Clin Microbiol* 44:1925-1929, 2006.
- Kruckeberg KE, Thibodeau SN. Pyrosequencing technology as a method for the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clin Chem* 50:522-529, 2004.
- Krüüner A, Pehme L, Ghebremichael S, Koivula T, Hoffner SE, Mikelsaar M. Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* 35:146-155, 2002.
- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 79:3-29, 1998.
- Riska PF, Jacobs WR Jr, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 4(2 Suppl. 1):S4-S10, 2000.
- Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363-365, 1998.
- Sinclair A, Arnold C, Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3620-3622, 2003.
- Zhao JR, Bai YJ, Zhang QH, Wang Y, Luo M, Yan XJ. Pyrosequencing-based approach for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51:135-137, 2005.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The

- catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 358:591-593, 1992.
13. 김종현. 항결핵제; 1. Isoniazid. 대한감염학회 편. 항생제의 길잡이, 3판, p374-377, 대한감염학회, 서울, 2008.
 14. 대한결핵 및 호흡기학회. 결핵진료 지침. 대한결핵 및 호흡기학회, 결핵 진료지침 위원회, 2005.