

Molecular Detection of Fluoroquinolone Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates

Chang-Ki Kim^{1,3}, Byung Soo Lee¹, Myung Joon Choi¹, Hee Jin Kim¹, Kyungwon Lee^{2,3}

¹Korean Institute of Tuberculosis, ²Department of Laboratory Medicine, ³Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Fluoroquinolones (FQs) are important drugs for treating multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). However, due to widespread use of FQs, the resistance rates to FQs have been increasing among *Mycobacterium tuberculosis*. Rapid and reliable FQ drug susceptibility testing (DST) is crucial for successful treatment of MDR-TB. In this study, the feasibility of molecular detection of FQ resistance was evaluated.

Methods: A total of 95 MDR-TB isolates were collected from Jan through Oct 2009 at the Korean Institute of Tuberculosis. DST for ofloxacin (OFL), levofloxacin, and moxifloxacin was performed using the Lowenstein-Jensen media absolute concentration method. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of these were determined using the broth microdilution method. DNA was extracted from cultured isolates using bead beating method. The quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* and *gyrB*

were amplified and those sequences were analyzed. **Results:** Of 95 isolates, 79 were resistant to at least one of FQs. Of these, 71 (89.9%) harbored mutation in the QRDR of *gyrA* or *gyrB*. None of FQ susceptible strains possessed any mutation in *gyrA* or *gyrB*. Mutations in codon 94 of *gyrA* were most common; only two isolates had mutation in only the *gyrB* gene. OFL MICs for isolates with *gyrA* mutation ranged from 1 to 32 μ g/mL, but FQ susceptible isolates showed MICs ranging from ≤ 0.06 to 0.5 μ g/mL.

Conclusion: Mutation analysis of QRDR of *gyrA* and *gyrB* showed 89.9% sensitivity and 100% specificity for detecting FQ resistance in MDR-TB. Therefore, molecular DST can be useful for rapid detection of FQ resistance in MDR-TB. (Ann Clin Microbiol 2014; 17:80-85)

Key Words: Fluoroquinolone, *gyrA*, *gyrB*, Multidrug-resistant tuberculosis

INTRODUCTION

결핵은 호흡기로 전파되는 전염성 질환으로 전세계적으로 많은 환자가 발생하고 있으며 이중 15%는 결핵으로 사망하고 있다. 결핵 퇴치를 위한 전세계적인 노력으로 인해 결핵의 유병률과 발생률이 감소추세에 있으나 내성결핵의 증가는 결핵 퇴치의 가장 큰 걸림돌 중 하나이다[1]. 다제내성결핵은 결핵치료에 있어서 가장 효과적인 초치료 약제인 isoniazid와 rifampicin에 동시 내성인 결핵을 의미하는데 이를 치료하기 위해서는 이차 약제를 오랜 기간 투여해야 한다[2]. 세계보건기구는 다제내성결핵 환자가 2012년에 450,000명이 발생하였고, 그 중 170,000명이 이로 인해 사망한 것으로 추정하고 있다[1].

Fluoroquinolone (FQ)계 항결핵제는 다제내성결핵의 치료에

서 있어서 가장 중요한 약제이다. 그러나 FQ는 여러 감염성 질환 치료에 흔히 사용되고 있으며, 다제내성결핵뿐만 아니라 일반적인 결핵치료에도 사용된 경우가 많아 내성 발생이 우려된다[3]. 따라서 다제내성결핵의 성공적인 치료를 위해서는 FQ의 내성여부를 확인하는 것이 필수적이다. FQ 내성을 확인하기 위해서 기존 감수성검사법을 이용할 경우 오랜 시간이 소요되는 문제가 있다[4]. 또한 통상적인 감수성검사는 감염위험이 매우 높은 검사로 특수 시설과 숙련된 검사자가 필요하다. 이런 기존 감수성검사법의 문제점을 보완하기 위해 내성관련 유전자 변이를 검출하는 신속내성검사법이 개발되었다. 다제내성결핵 진단을 위해 rifampicin 혹은 rifampicin과 isoniazid에 대한 신속내성검사법이 개발되었고 여러 나라에서 그 유용성이 증명되었다[5,6]. 최근에는 이차약제 내성을 검출할 수 있는 신

Received 30 April, 2014, Revised 6 June, 2014, Accepted 13 June, 2014

Correspondence: Kyungwon Lee, Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, 50 yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. (Tel) 82-2-2228-2446, (Fax) 82-2-313-0956, (E-mail) leekcp@yuhs.ac

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

속진단 시약들이 소개되고 있다[7-11]. 그러나 FQ에 대한 신속 내성검사의 민감도와 특이도가 다르게 보고되고 있으며 이에 관한 국내 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 다제내성결핵균을 대상으로 FQ 내성과 연관성이 있는 것으로 알려진 *gyrA*와 *gyrB* 유전자 변이를 분석하고 이를 이용한 FQ 신속내성검사의 유용성을 평가하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상 결핵균

2009년 1월부터 10월까지 결핵연구원으로 감수성검사가 의뢰된 결핵균 중에서 isoniazid와 rifampicin에 동시내성인 다제내성균을 대상으로 하였다. Ofloxacin (OFL) 내성인 균주와 감수성인 균주를 구분하여 수집하였다. 시험균주는 추가 실험을 위해서 10% skim milk를 이용하여 -70°C 에서 보관하였다.

2. 항결핵제 감수성검사

항결핵제 감수성검사는 Lowenstein-Jensen (LJ) 배지를 이용한 절대농도법으로 시험하였으며 항결핵제 내성기준농도는 다음과 같다: isoniazid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) $0.2 \mu\text{g/mL}$, rifampicin (Sigma-Aldrich) $40 \mu\text{g/mL}$, OFL, levofloxacin (LEV) (Sigma-Aldrich) 및 moxifloxacin (MOX) (Sigma-Aldrich) $2 \mu\text{g/mL}$. 접종균액(inoculum)을 제조하기 위해 백금이로 2% Ogawa 배지 사면을 전체적으로 긁어 전체 집락에서 균을 채취하였다. 균집락을 유리구슬이 담긴 McCartney 병에 옮겨 진탕하여 파쇄하였으며 에어로졸이 가라앉은 후에 완충액을 넣어 탁도를 McFarland No.1로 맞추었다. 상층액을 조심스럽게 멸균 튜브에 옮겨 다시 완충액으로 1:10으로 희석한 후 $25 \mu\text{L}$ 씩 약제가 포함된 배지와 대조배지에 각각 접종하였다. 접종된 배지는 37°C 대기조건에서 4주간 배양한 후 대조배지 증식이 3+ 혹은 4+로 충분하고 약제 배지에서 20개 이상의 집락이 관찰된 경우 내성으로 판정하였다. 대조배지 증식이 불충분한 경우 2주 추가배양을 실시한 후에 결과를 판정하였다. 6주간의 배양에도 대조배지의 증식이 충분하지 않은 경우 감수성검사를 다시 시행하였다.

3. 염기서열 분석

DNA 추출은 heat extraction법을 이용하였다. 2% Ogawa 배지 사면에서 균집락을 멸균 증류수 1 mL 가 담긴 튜브에 넣어 부유시킨 후 100°C 에서 10분간 중탕하고 원심분리 후 상층액을 주형 DNA로 사용하였다. PCR 증폭을 위해 AccuPower[®] HF PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하였으며 각 튜브에 멸균 증류수 $45 \mu\text{L}$ 와 시발체를 각각 $1 \mu\text{L}$ 씩 넣고 주형 DNA $3 \mu\text{L}$ 를 첨가하였다. *gyrA*와 *gyrB* 유전자 증폭과 염기서열 분석에 이용된 시발체는 Table 1에 요약하였다. *gyrA*와 *gyrB*의 quinolone resistance-determining region (QRDR) PCR 증폭은 다음과 같은 조건에서 시행되었다. 94°C 에서 5분간 반응시킨 후, 94°C 에서 1분, 55°C 에서 30초, 72°C 에서 1분씩 35회 증폭 반응시키고, 72°C 에서 7분간 연장반응시켰다. 증폭산물을 DNA extraction kit로 분리 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)과 ABI PRISM 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. QRDR에서 유전자 변이가 관찰되지 않은 경우 *gyrA* 전체 유전자를 증폭하여 QRDR 이외의 부위에서의 유전자 변이를 확인하였다.

4. 최소억제농도 측정

FQ계 항결핵제의 최소억제농도(minimum inhibitory concentrations, MIC)는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M24-A2에 따라 액체배지 미량희석법을 이용하여 측정하였다[14]. 배지는 Middlebrook 7H9 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하였으며 5%의 oleic acid-albumin-dextrose-catalase (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)를 첨가하였다. 결핵균 집락은 유리구슬이 담긴 McCartney 병에 넣어 파쇄한 후 완충액으로 희석하여 McFarland No. 0.5로 균액을 제조한 후 다시 1:100으로 희석하여 각 well에 $10 \mu\text{L}$ 씩 접종하였다. CO_2 배양기에서 3주간 배양한 후 MIC를 판정하였다. 시험 약제는 OFL, LEV 그리고 MOX이었으며 OFL과 LEV의 시험농도범위는 $0.06\text{--}64 \mu\text{g/mL}$ 였고 MOX은 $0.03\text{--}32 \mu\text{g/mL}$ 였다.

Table 1. Primers used for PCR amplification and sequencing

Primer	Target gene	Nucleotide sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
<i>gyrA</i> F	<i>gyrA</i>	GATGACAGACACGACGTTGC	398	[12]
<i>gyrA</i> R		GGGCTTCGGTGTACCTCAT		[12]
<i>gyrA2</i> F		GGGCAACTTCGGCTCGC	1,883	This study
<i>gyrA2</i> R		GCAGATAGGTGCCTTCACG		This study
<i>gyrA2</i> seq	<i>gyrB</i>	CGGGTCGGTTTACGCATCG		This study
GYRB-1		CCACCGACATCGGTGGATT	428	[13]
GYRB-2		CTGCCACTTGAGTTGTACA		[13]

Table 2. Mutations in *gyrA* and *gyrB* genes of multidrug-resistant tuberculosis isolates and susceptible isolates

Mutation in gene		No. of isolates resistant to OFL, LEV and MOX				Total
<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	R to all	R to OFL and LEV	R to only OFL	S to all	
Gly88Ala	Asn499Lys	1	-	-	-	1
Ala90Val	WT	6	4	-	-	10
Ala90Val	Met474Ile	-	1	-	-	1
Ala90Val	Asp461Asn	1	-	-	-	1
Ala90Val	Gly512Arg	-	1	-	-	1
Ser91Pro	WT	6	1	1	-	8
Asp94Ala	WT	5	1	-	-	6
Asp94Ala	Leu479Phe	1	-	-	-	1
Asp94Gly	WT	22	-	-	-	22
Asp94Gly	Asn499Lys	1	-	-	-	1
Asp94Gly	Ala504Val	1	-	-	-	1
Asp94Gly	Gly512Arg	5	-	-	-	5
Asp94His	WT	1	1	-	-	2
Asp94Asn	WT	5	-	-	-	5
Double peaks at 280, 281	WT	1	-	-	-	1
Ala90Val, Asp94Gly	WT	2	-	-	-	2
Ala90Val, Ser91Pro	WT	-	1	-	-	1
WT	Asp461Lys	1	-	-	-	1
WT	Asn499Asp	-	-	1	-	1
WT	WT	4	2	2	16	24
Total		63	12	4	16	95

Abbreviations: WT, wild type; OFL, ofloxacin; LEV, levofloxacin; MOX, moxifloxacin; R, resistant; S, susceptible.

RESULTS

총 95주의 다제내성결핵균을 수집하였고 이 중 79주는 하나 이상의 FQ에 내성이었으며 나머지 16주는 세가지 FQ에 감수성이었다. *gyrA*와 *gyrB* 유전자 변이는 71주에서 발견되었는데 모두 FQ에 내성이었으며 FQ 내성주 중 89.9%에 해당하였다 (Table 2). *gyrA* 변이는 69주에서 확인되었으며 가장 흔한 (n=31) 유전자 변이는 Asp94Gly이었고, 그 다음으로 Ala90Val이 흔하였다(n=16). 두 종류의 *gyrA* 변이가 동시에 관찰된 경우도 있었는데 Ala90Val/Asp94Gly가 2건, Ala90Val/Ser91Pro이 1건 있었으며, 한 균주에서는 280번과 281번 nucleotide에 G/T와 A/G dual peak이 관찰되었다. *gyrB*의 경우 14주에서 변이가 관찰되었고 가장 흔한 변이는 Gly512Arg로 6주에서 관찰되었다. 12균주에서 *gyrA*와 *gyrB* 유전자변이가 동시에 발견되었으며, FQ내성이지만 8주에서는 *gyrA*와 *gyrB*의 QRDR 유전자변이가 확인되지 않았다.

MIC 측정은 86주에서 시험하였으며 *gyrA*만 변이가 있는 균주(*GyrA*), *gyrB*만 변이가 있는 균주(*GyrB*), *gyrA*와 *gyrB*에 변이가 동시에 있는 균주(*GyrA+B*), FQ에 내성이지만 QRDR에서 변이가 없었던 균주(wild type, WT) 그리고 FQ에 감수성인 대조균주(Susceptible control, SC)로 구분하였다. *GyrA*군(n=

44)에 대한 MIC 범위는 OFL, LEV 그리고 MOX이 각각 1-32 $\mu\text{g/mL}$, 0.5-16 $\mu\text{g/mL}$ 및 0.25-4 $\mu\text{g/mL}$ 였다(Fig. 1). *GyrB*군(n=2)의 경우 OFL, LEV 및 MOX의 MIC 범위는 각각 1-8 $\mu\text{g/mL}$, 0.5-8 $\mu\text{g/mL}$ 및 0.5-2 $\mu\text{g/mL}$ 였다. *GyrA+B*군(n=11)에 대한 MIC 범위는 *GyrA*와 *GyrB*군에 대한 MIC 범위와 비슷하였는데 OFL, LEV 및 MOX의 MIC 범위는 2-8 $\mu\text{g/mL}$, 1-16 $\mu\text{g/mL}$ 및 0.5-8 $\mu\text{g/mL}$ 였다. FQ에 감수성인 대조균은 25주였으며 OFL, LEV 및 MOX MIC 범위는 각각 ≤ 0.06 -0.5 $\mu\text{g/mL}$, ≤ 0.06 -0.25 $\mu\text{g/mL}$ 및 ≤ 0.03 -0.25 $\mu\text{g/mL}$ 였다.

DISCUSSION

다제내성결핵의 증가는 결핵관리에 있어서 중요한 걸림돌 중 하나인데, 다제내성결핵의 치료를 위해서 여러 종류의 이차 약제의 사용이 필요하다. FQ는 다제내성결핵 치료에 있어서 매우 중요한데, FQ에 내성인 경우 치료효율이 크게 낮아진다 [15]. FQ는 결핵치료뿐만 아니라 지역사회 폐렴과 같은 호흡기 감염질환에도 흔히 사용되는데 실제 FQ를 처방 받았던 결핵환자군에서 FQ를 처방 받지 않았던 환자에 비해 내성발생 위험도(odd ratio)가 2.7배 높았고 치료지연과 연관이 있는 것으로 보고되었다[3]. 광범위약제내성결핵은 다제내성이면서 주사제

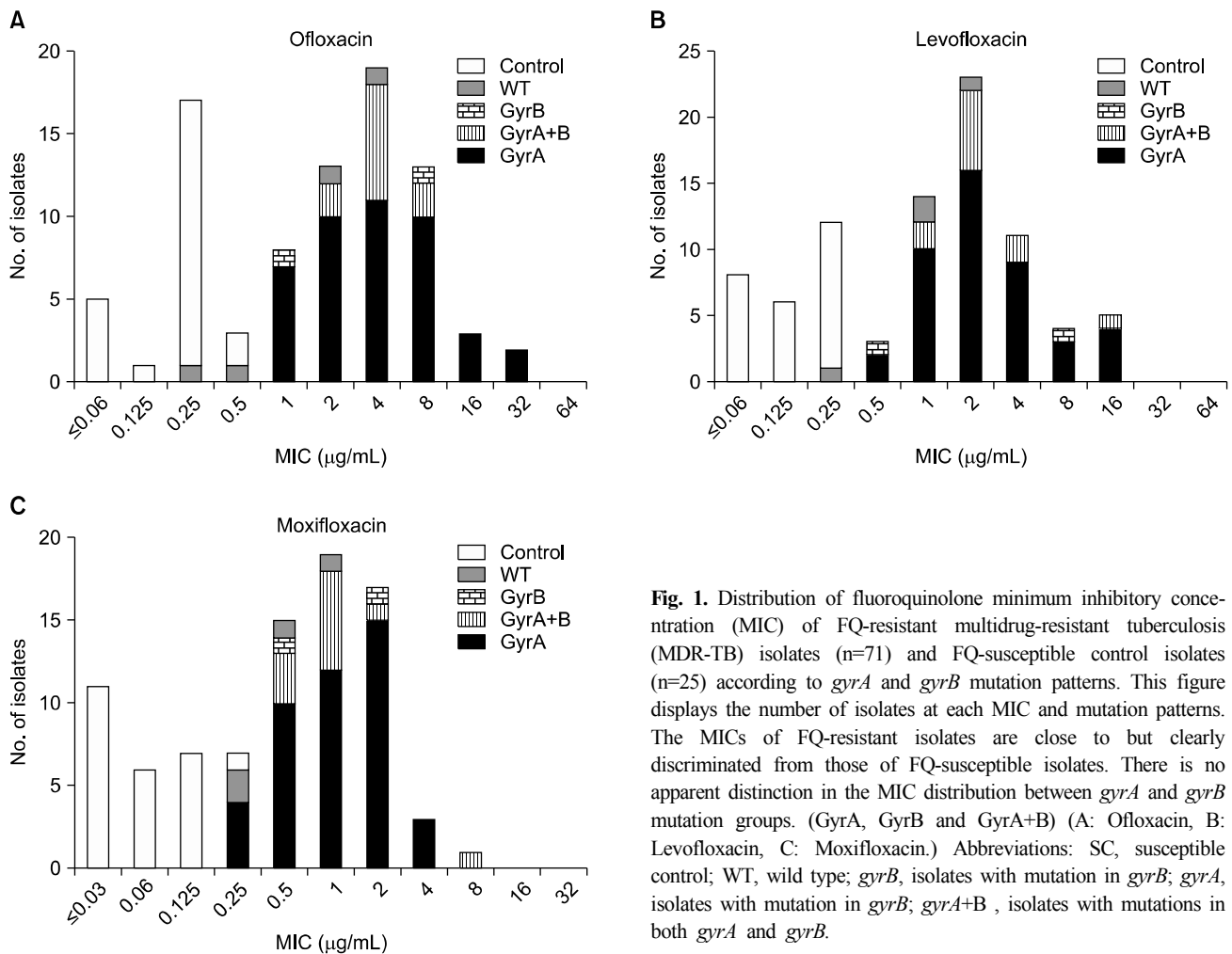


Fig. 1. Distribution of fluoroquinolone minimum inhibitory concentration (MIC) of FQ-resistant multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) isolates (n=71) and FQ-susceptible control isolates (n=25) according to *gyrA* and *gyrB* mutation patterns. This figure displays the number of isolates at each MIC and mutation patterns. The MICs of FQ-resistant isolates are close to but clearly discriminated from those of FQ-susceptible isolates. There is no apparent distinction in the MIC distribution between *gyrA* and *gyrB* mutation groups. (GyrA, GyrB and GyrA+B) (A: Ofloxacin, B: Levofloxacin, C: Moxifloxacin.) Abbreviations: SC, susceptible control; WT, wild type; *gyrB*, isolates with mutation in *gyrB*; *gyrA*, isolates with mutation in *gyrA*; *gyrA+B*, isolates with mutations in both *gyrA* and *gyrB*.

와 FQ에 내성인 결핵을 의미하는데 일반적인 다제내성결핵에 비해 치료 성공률이 유의하게 낮다[16]. 다제내성결핵에서 발생한 FQ 내성은 광범위약제내성의 전단계로 판단된다. 국내 다제내성결핵의 비율은 2004년 내성률조사에서 신환자의 2.7%이었으나[17], 2008년 의무기록조사 결과 2.9%로 증가하였으며, 다제내성결핵의 27.8%가 광범위약제내성 결핵으로 밝혀졌다[18].

FQ은 DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV을 변형시켜 세균을 사멸시키는데 결핵균은 DNA topoisomerase IV가 없기 때문에 DNA gyrase가 유일한 FQ의 작용부위다[19]. DNA gyrase는 두 개의 subunit으로 구성되는데 *gyrA*와 *gyrB* 유전자에 의해 encoding된다. FQ 내성은 *gyrA*와 *gyrB* QRDR의 변이와 연관성이 높다고 알려져 있다. *gyrA*의 QRDR 변이를 검출하는 FQ 신속내성 진단시약이 개발되었고, 내성검출 민감도가 70.3%에서 92.3%, 특이도가 91.1%에서 100%로 다양하게 보고되었다[7-11,20]. 본 연구에서 *gyrA*의 QRDR을 분석한 경우 민감도가 87.3%이었으며 *gyrB*를 함께 분석하였을 때 민감도가 89.9%로 약 2% 정도 민감도가 높아졌다. 신속진단시약 개발 시 *gyrA*만

을 분석하여도 비교적 높은 수준의 민감도를 얻을 수 있으나 *gyrB* 돌연변이가 있는 내성균주도 있으므로 두 유전자를 모두 분석하는 것이 좋을 것으로 판단된다. *gyrB* 유전자 변이가 FQ 내성을 유발하는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 연구가 *gyrA*에 비해서는 적다[19]. 또한 FQ 내성균주 중에서 *gyrB* 변이 빈도가 높지 않고, *gyrA* 유전자 변이와 함께 발견되는 경우가 많다. 한편 기존 연구에서 보고한 유전자 변이와 본 연구의 *gyrB* 유전자 변이를 비교하는데 어려움이 있었다. 이는 GyrA와 달리 GyrB의 아미노산 번호가 연구자마다 다르기 때문인데 본 연구에서는 Maruri 등[19]이 제안한 방식으로 분석하였다. 그러나 2012년 Campbell 등[10]은 기존 연구와 다른 새로운 번호 체계로 보고하여 혼선을 더 하고 있다. 향후 검사진단 시약 개발이나 내성기전 연구를 위해서 *gyrB* 유전자에 대한 정확한 정보가 확립되어야 할 것으로 판단된다. *gyrA* 유전자 변이는 codon 94에서 가장 흔하였는데 기존 연구와 동일하였다[19,21]. FQ에 내성이지만 8주에서 QRDR 변이가 검출되지 않았는데 *gyrA* 전체 염기서열을 분석한 결과 변이가 관찰되지 않았다. 이들 FQ 내성균주는 efflux pump 등의 다른 내성기전에 의한

것으로 추정되었다[19]. *gyrA*와 *gyrB* 유전자 분석을 통한 내성 검출의 특이도는 100%로 매우 우수하였으며 양성예측도는 100%, 음성예측도는 67.7%였다. 그러나 본 연구에서 실험한 균주의 FQ 내성비율이 매우 높았기 때문에 임상검체에 적용을 하였을 때 실제 양성예측도 및 음성예측도와는 차이가 있을 것으로 보인다. 다만 *gyrA*와 *gyrB* 유전자 분석이 높은 특이도를 보였기 때문에 위내성 발생 가능성은 낮다고 판단된다.

FQ제인 OFL, LEV 및 MOX의 MIC를 시험하였고 유전자변이에 따라 분석하였다. 우선 FQ 내성인 균주와 감수성인 균주 간에 대한 MIC 값의 차이가 크지 않았다. 실제 내성균에 대한 OFL의 MIC는 0.25-32 $\mu\text{g/mL}$ 였으나 감수성 균주에 대한 MIC는 ≤ 0.06 -0.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 일부 MIC 값이 중복된다. FQ 내성균과 감수성균에 대한 MIC 분포가 가깝지만 비교적 뚜렷하게 구분되었다. MIC 측정 시 사용된 Middlebrook 7H9 배지에 대한 FQ 내성기준은 없으나[14], OFL은 1 $\mu\text{g/mL}$, LEV는 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 MOX는 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 를 기준으로 할 경우 내성과 감수성을 잘 구분할 수 있었다. 또한 FQ 중에서 OFL의 MIC가 가장 높았으며 MOX의 MIC가 가장 낮음을 알 수 있었다. Middlebrook 7H10 한천배지 내성비율법(proportion method)으로 검사를 할 경우 OFL, LEV 및 MOX에 대한 내성기준이 각각 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ 및 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 인 것을 고려할 때 비슷한 경향을 확인할 수 있었다[14]. *gyrA*와 *gyrB* 모두에서 변이가 있는 균주에 대한 FQ MIC 값이 *gyrA* 혹은 *gyrB* 유전자에 변이가 있는 균주에 비해서 차이가 없었다. 또한 *gyrA* 유전자에 두 종류의 변이가 함께 발견된 경우에도 단일 종류의 변이가 관찰된 균주보다 FQ MIC 값이 높지 않았다. 따라서 변이의 개수가 많더라도 FQ MIC 값의 유의한 상승은 없는 것으로 판단되었다. Kam 등[21]은 FQ 내성균 중에서 *gyrA*의 Asp94Gly 변이가 가장 흔하게 발견되며 다른 변이에 비해 높은 FQ MIC를 보인다고 하였다. 본 연구에서도 Asp94Gly 변이가 확인된 균주는 23주(29.1%)로 가장 많았고, 대부분 OFL MIC 값이 4 또는 8 $\mu\text{g/mL}$ 이어서 다른 변이에 비해 약간 높았지만 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

결론적으로 *gyrA*와 *gyrB* 유전자의 QRDR 분석을 통한 FQ 내성검출은 높은 민감도와 특이도를 보였다. 통상 감수성검사의 검사소요시간과 높은 결핵감염위험성을 고려할 때 분자생물학적 FQ 신속내성검사의 유용성이 높다고 판단되었다.

REFERENCES

1. WHO. Global tuberculosis control: WHO report 2012. Geneva, Switzerland: WHO press; 2013.
2. Johnston JC, Shahidi NC, Sadatsafavi M, Fitzgerald JM. Treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. PLoS One 2009;4:e6914.
3. Devasia RA, Blackman A, Gebretsadik T, Griffin M, Shintani A, May C, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: the effect of duration and timing of fluoroquinolone exposure. Am J Respir Crit Care Med 2009;180:365-70.
4. Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. Eur Respir J 2005;25:564-9.
5. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med 2010;363:1005-15.
6. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am J Respir Crit Care Med 2008;177:787-92.
7. van Ingen J, Simons S, de Zwaan R, van der Laan T, Kamst-van Agterveld M, Boeree MJ, et al. Comparative study on genotypic and phenotypic second-line drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2010;48:2749-53.
8. Kiet VS, Lan NT, An DD, Dung NH, Hoa DV, van Vinh Chau N, et al. Evaluation of the MTBDRs/ test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2010;48:2934-9.
9. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRs/ assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. J Clin Microbiol 2009;47:1767-72.
10. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:2032-41.
11. Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType MTBDRs/ test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2010;48:1683-9.
12. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2007;45:179-92.
13. Wang JY, Lee LN, Lai HC, Wang SK, Jan IS, Yu CJ, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure. J Antimicrob Chemother 2007;59:860-5.
14. CLSI. Susceptibility testing of mycobacteria, *Nocardiae*, and other aerobic actinomycetes; approved standard-second edition. CLSI document M24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
15. Yew WW and Lange C. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt? Int J Tuberc Lung Dis 2014;18:1-2.
16. Kwon YS, Kim YH, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ, et al. Treatment outcomes for HIV-uninfected patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis 2008;47:496-502.
17. Bai GH, Park YK, Choi YW, Bai JI, Kim HJ, Chang CL, et al. Trend of anti-tuberculosis drug resistance in Korea, 1994-2004. Int J Tuberc Lung Dis 2007;11:571-6.
18. Park YS, Hong SJ, Boo YK, Hwang ES, Kim HJ, Cho SH, et al. The national status of tuberculosis using nationwide medical records survey of patients with tuberculosis in Korea. Tuberc Respir Dis (Seoul) 2012;73:48-55.

19. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. J Antimicrob Chemother 2012;67:819-31.
20. Huang WL, Chi TL, Wu MH, Jou R. Performance assessment of the GenoType MTBDRs/ test and DNA sequencing for detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2011;49:2502-8.
21. Kam KM, Yip CW, Cheung TL, Tang HS, Leung OC, Chan MY. Stepwise decrease in moxifloxacin susceptibility amongst clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: correlation with ofloxacin susceptibility. Microb Drug Resist 2006 12:7-11.

=국문초록=

다제내성결핵균에서 유전자 변이분석을 이용한 퀴놀론 내성검출의 유용성 평가

¹대한결핵협회 결핵연구원, 연세대학교 의과대학 ²진단검사의학교실, ³세균내성연구소

김창기^{1,3}, 이병수¹, 최명준¹, 김희진¹, 이경원^{2,3}

배경: Fluoroquinolone (FQ)는 다제내성결핵 치료에 있어서 중요한 약제이다. 근래 광범위한 FQ의 사용으로 인해 결핵균에서의 내성이 증가하고 있어 신속하고 정확한 FQ 내성검사의 필요성이 커지고 있다. 본 연구에서는 분자생물학적 방법을 이용한 결핵균 FQ 내성검출의 유용성을 평가하고자 하였다.

방법: 2009년 1월부터 10월까지 수집된 95개의 다제내성결핵균을 대상으로 하였다. Ofloxacin (OFL), levofloxacin 그리고 moxifloxacin에 대한 감수성은 Lowenstein-Jensen배지 절대농도법으로 시험하였고 내성기준 농도는 동일하게 2.0 μ g/mL을 이용하였다. 액체배지 미량희석법으로 세 약제의 최소억제농도를 시험하였으며 *gyrA*와 *gyrB* 유전자의 quinolone-resistance determining region (QRDR) 염기서열을 분석하였다.

결과: 95주 중에서 79주가 하나 이상의 FQ에 내성이었고, 이중 71 (89.9%)주에서 *gyrA* 혹은 *gyrB*의 QRDR에 변이가 발견되었다. 반면 FQ에 감수성인 균주에서는 변이가 관찰되지 않았다. *gyrA* 유전자의 codon 94 위치에 변이가 가장 흔하였고 2주에서 *gyrB* 변이만 관찰되었다. *gyrA* 유전자 변이가 확인된 균주에 대한 OFL 최소억제농도는 1-32 μ g/mL이었으나, FQ 감수성 균주에 대한 OFL 최소억제농도는 ≤ 0.06 -0.5 μ g/mL로 차이가 있었다.

결론: *gyrA*와 *gyrB* QRDR 변이분석의 FQ 내성검출 민감도와 특이도가 89.9%와 100%로 우수하여 다제내성결핵균에서 신속한 FQ 내성검출에 유용할 것으로 판단되었다. [Ann Clin Microbiol 2014;17:80-85]

교신저자 : 이경원, 120-752, 서울시 서대문구 연세로 50
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 02-2228-2446, Fax: 02-313-0956
E-mail: leekcp@yuhs.ac