

## Denaturing HPLC를 이용한 리팜핀 내성 결핵균의 검출

남윤형<sup>1</sup> · 이상현<sup>1</sup> · 안영창<sup>1</sup> · 조민호<sup>1</sup> · 장원철<sup>1</sup> · 박수민<sup>2</sup> · 권필승<sup>3</sup> · 김종완<sup>4</sup>

단국대학교 첨단과학부 화학과 기초과학연구소, 제넷바이오<sup>2</sup>, 단국대학교병원 진단검사의학과<sup>3</sup>, 단국대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>4</sup>

### Detection of Rifampin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex using Denaturing HPLC

Youn Hyoung Nam, M.S.<sup>1</sup>, Sang Hyun Lee, M.S.<sup>1</sup>, Young Chang Ahn, M.S.<sup>1</sup>, Min Ho Cho, M.S.<sup>1</sup>, Won Cheoul Jang, Ph.D.<sup>1</sup>,  
Su-Min Park, M.S.<sup>2</sup>, Pil Seung Kwon, M.S.<sup>3</sup>, and Jong Wan Kim, M.D.<sup>4</sup>

Department of Chemistry<sup>1</sup>, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute Dankook University, Cheonan; GeNet Bio  
Chungnam Animal Science Center<sup>2</sup>, Konyang University, Nonsan; Department of Laboratory Medicine<sup>3</sup>, Dankook University Hospital,  
Cheonan; Department of Laboratory Medicine<sup>4</sup>, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

**Background :** Tuberculosis (TB) remains an important cause of morbidity and mortality throughout the world. The surge of TB has been accompanied by an increase in multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB). In this study, we developed a denaturing HPLC (DHPLC) method for detecting *rpoB* gene mutation as a rifampin resistance based on sequence.

**Methods :** In this study, we used 99 mycobacterial isolates grown in Ogawa media. At first, we used a PCR method that can amplify the 235 bp and 136 bp *rpoB* DNAs of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) and Non-tuberculous mycobacteria (NTM). And then, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) of *rpoB* DNA (342 bp), which comprises the Rif<sup>r</sup> region, was used for the differential identification of Mycobacteria. Finally, we detected these amplicons by DHPLC, compared to PCR-RFLP results, and performed sequencing.

**Results :** Among 99 mycobacterial isolates, 80 (81%) were MTB and 19 (19%) were NTM. NTM were identified to 7 different species by DHPLC and PCR-RFLP. *rpoB* mutation was detected in 9 (11%) of the MTB specimens. These results were confirmed by using sequencing.

**Conclusions :** DHPLC provided a rapid, simple, and automatable performance for detection of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex and would be helpful as a supplemental method in high-throughput clinical laboratories. (*Korean J Lab Med* 2008;28:95-102)

**Key Words :** Tuberculosis, Multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB), Non-tuberculous mycobacteria (NTM), Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

## 서 론

접 수 : 2007년 9월 27일      접수번호 : KJLM2072  
수정본접수 : 2008년 2월 5일  
게재승인일 : 2008년 2월 22일  
교신저자 : 김 중 완  
우 330-715 충남 천안시 안서동 산16-5  
단국대학교 의료원 진단검사의학과  
전화 : 041-550-6662, Fax : 041-555-7155  
E-mail : wan1818@paran.com

\*본 연구는 2006년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

결핵은 전 세계적으로 매년 약 200만 명의 목숨을 앗아가는 중대한 감염성 질환으로, 2006년 세계보건기구의 발표에 의하면 2004년에 약 880만 명(140명/10만 명)의 새로운 환자가 발생하였고, 이 중 390만 명(62명/10만 명)은 전염성이 매우 높은 도말 양성 환자이며 이 중 74만 명은 HIV에 감염된 성인 환자라고 하였다[1]. 2004년 국내의 통계에 따르면, X선 소견상 활동

성인 결핵 환자가 약 18만 명, 항산균 양성인 환자가 약 8만 명인 것으로 추정되며, 한 해 동안 결핵정보 감시체계를 통해 신고된 결핵 신환자가 3만 6천여 명, 같은 해에 결핵으로 사망한 사람이 무려 3,352명(7명/10만 명)에 달한다[2].

이러한 가운데 다제 내성 결핵(multi-drug-resistant tuberculosis, MDR-TB)의 발생은 국제적인 결핵관리에 위협으로 다가오고 있다. 결핵은 항결핵제의 효율적인 사용으로 1980년대 말까지는 계속 감소하는 추세였으나, 1990년대에 내성 결핵균과 후천성 면역결핍 환자의 증가와 더불어, 불안정한 결핵관리체계, 치료효율의 저하로 치료에 실패하는 경우가 생겼으며 또한, 약제 내성 문제가 결핵 치료에 큰 장애가 되고 있다[3-5]. 1995년 Morris 등[6]은 MDR-TB는 병의 진행속도가 빨라 사망률이 50-60%에 이르므로 효과적인 치료를 위하여 조기 진단 및 신속한 약제 내성 검사법이 요구된다고 하였다. 대부분의 MDR-TB는 항결핵제인 isoniazid (INH)와 리팜핀 등에 내성을 가진 결핵균에 의해 발병한다[7]. 리팜핀은 살균작용이 강하고 약제 내성을 일으킬 위험이 가장 적지만, 실제 임상적으로는 다른 약제와 같이 병용하지 않을 경우 쉽게 내성을 일으킬 수 있다고 알려져 있다[8, 9]. 내성 기전은 많이 연구되어졌는데, 리팜핀 내성 결핵균의 조기 검출이 MDR-TB의 진단에 중요한 인자가 된다고 하였다[10]. 임상검사실에서 약제 내성 결핵균을 검출하려면 3-8주간 균을 배양한 후 항결핵제 감수성 검사를 위하여 추가로 3-6주가 필요하다. 그러므로 임상 검체에서 결핵균과 리팜핀 내성 결핵균의 조기 검출에 분자생물학적인 방법이 도입되었다[11]. 그러나 결핵균 검출에 이용되는 분자생물학적방법은 대개 수기법이므로 많은 시간과 노력이 들고, 시험의 재현성과 정확도가 검사자 간에 많은 차이를 보일 수 있다. 1996년에 Underhill와 Oefner 등[12]에 의해서 처음으로 PCR 산물을 정제하지 않고도 분석이 가능한 PCR-denaturing HPLC (PCR-DHPLC)법이 이용되어 최근 단일염기 다형성 연구에 많이 사용되고 있다. 이 방법은 PCR 증폭산물의 크기가 200-1,000 bp에서 95-100% 가까운 정확도를 나타내며, 시료당 분석에 걸리는 시간이 5-7분 내외로 다량의 시료를 분석하는데 매우 유용한 방법이다. 최근에는 DHPLC법이 자궁경부암에서 *p53* 유전자의 돌연변이 검출에 정확도 및 경제성 등이 뛰어나고, 많은 양의 검체를 처리할 수 있는 우수한 방법으로 보고되고 있다[13].

따라서 본 연구에서는 비용이 적게 들고 재현성이 뛰어나며, 자동화가 가능한 DHPLC를 이용하여 리팜핀 내성 표지자인 RNA polymerase  $\beta$ -subunit-encoding gene (*rpoB*) 유전자의 돌연변이를 검출하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

단국대학병원에서 항산균 도말 및 배양 검사가 의뢰된 검체 중 Ziehl-Neelsen 염색결과 양성이고, 3% 오가와 배지(Shinyang chemical, 서울, 한국)에 21일간 배양 후 집락이 형성된 99개의 균주를 대상으로 하였다.

### 2. 시약 및 기기

#### 1) 시약

PCR은 PrimeTaq. 반응혼합액(GeNet Bio, 논산, 한국)을 사용하였고, 염기서열 분석을 위한 PCR 산물의 정제에는 AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer, 대전, 한국)를 사용하였다. QA-Agarose (Q-bio gene, Solon, OH, USA)를 이용하여 전기영동을 하였다. DHPLC의 이동상으로 triethylammonium acetate (Transgenomic, Omaha, NE, USA)와 acetonitrile (Merck, Hunterdon, NJ, USA)을 사용하였다.

#### 2) 기기

PCR은 GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하였고, PCR 결과확인용 Mupid-a (Advance, Tokyo, Japan) 전기영동장치를 이용하였다. DHPLC는 WAVE® SYSTEM (Transgenomic)을 사용해 돌연변이를 검출하였다. 염기서열분석기는 ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 돌연변이 형을 확인하였다.

### 3. DNA 추출과 PCR

#### 1) 결핵균의 DNA 추출

3% 오가와 배지에 배양된 균에 1 M NaOH 1 mL를 넣은 후, 15분간 끓는 물에 중탕하였다. 이 용액에 PCI-9을 동량 넣고, 12,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 여기에 2 M sodium acetate와 100% 에탄올을 넣은 후 세척하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 0.8% 아가로오즈 겔에서 100 V로 30분간 전기영동하여 확인하였다.

#### 2) PCR에 의한 결핵균종 확인

*rpoB*에는 결핵균군(*Mycobacterium tuberculosis* complex,

MTB)과 비결핵균군(Non-tuberculous *mycobacteria*, NTM)의 특이한 뉴클레오티드가 존재한다. 이 차이를 이용해서 Tbc1 (5'-CGT ACG GTC GGC GAG CTG ATC CAA-3'), TbcR5 (5'-C CAC CAG TCG GCG CTT GTG GGT CAA-3') 시발체 세트와 M5 (5'-G GAG CGG ATG ACC ACC CAG GAC GTC-3'), RM3 (5'-CAG CGG GTT GTT CTG GTC CAT GAA-3') 시발체 세트를 준비하였다[14, 15]. PCR 반응혼합액 (2.5 U의 Taq 중합효소, 250  $\mu$ M의 dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 완충액 포함)에 각각의 시발체(10 pmol)와 DNA 2  $\mu$ L씩을 넣어 최종 20  $\mu$ L가 되게 하였다. 이 혼합액을 thermal cycler GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems)를 이용하여 94°C에서 10분간 반응시킨 후, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 40초의 조건으로 30주기, 그 후에 72°C에서 5분 동안 반응시켰다. 증폭산물을 1.5% 아가로오즈겔에서 100 V로 30분간 전기영동하여 유전자 분해를 확인하여 판독하였다.

#### 4. PCR-RFLP에 의한 결핵균속 검출

결핵균 특이 시발체인 MF (5'-CGA CCA CTT CGG CAA CCG-3'), MR (5'-TCG ATC GGG CAC ATC CGG-3')을 이용하여 얻어진 증폭산물을 제한절편길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)법을 이용하여 분석하였다. 제한효소 *Hae III* (Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 3% 아가로오즈겔에서 100 V로 35분간 전기영동을 시행하였다. 이 결과의 해석은 김 등[14, 15]의 방법에 따라 하여, 절편의 크기로 신속발육균과 완속발육균을 구별하였으며 그 결과를 size based DHPLC와 염기서열분석의 결과와 비교하였다.

#### 5. DHPLC 분석

##### 1) Size based DHPLC법에 의한 균속 검출

PCR-RFLP법으로 얻어진 산물을 DHPLC법으로 단일 염기 다형성을 검출하였다. Column의 재현성과 완충용액 이동상의 상태를 확인하기 위해 표지자(Transgenomic)를 5  $\mu$ L씩 3번 주입하여 분석하였다. 이 후 PCR-RFLP 산물 5  $\mu$ L를 column oven 온도 50°C에서 이동상의 속도를 0.75 mL/min로 주입하여 non-denaturing HPLC로 분석하였다. 표지자의 크기는 80, 102, 174, 257, 267, 298, 434, 458, 587 bp를 사용하였다. 이 결과와 PCR-RFLP법 결과와 비교하였다.

##### 2) Partially DHPLC법을 이용한 *rpoB* 내성균 검출

Ion-pair reversed-phase (IP-RP) HPLC 방식을 이용하고 poly (styren-divinylbenzene)로 채워진 DNASep® Cartridge (Transgenomic)를 고정상으로 사용하였다. TR8 (5'-TCG CCG CGA TCA AGG AGT-3')과 TR9 (5'-TGC ACG TCG CGG ACC TC A-3') 시발체를 이용하여 PCR을 하였다[16]. PCR 반응혼합액(2.5 U의 Taq. 중합효소, 250  $\mu$ M의 dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 완충액 포함)에 각각의 시발체(10 pmol)와 DNA 2  $\mu$ L씩을 넣어 최종 20  $\mu$ L가 되게 하였다. 이 혼합액을 thermal cycler GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems)를 이용하여 94°C에서 10분간 반응시킨 후, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 40초의 조건으로 30주기 반응시킨 후 마지막 신장 단계로 72°C에서 5분 동안 반응시켰다.

증폭된 산물을 thermal cycler를 사용하여 95°C에서 10분간 변성시킨 후 상온에서 45분간 서서히 reannealing 시켜 이형접합체(heteroduplex)를 만든다. 이 산물을 DHPLC (Transgenomic)를 이용하여 분석하였다. 이동상으로는 0.1 M triethylammonium acetate, pH 7 (buffer A)와 25% acetonitrile이 포함된 0.1 M triethylammonium acetate (buffer B)를 사용하였다. Column oven의 온도를 각각 65, 66, 67°C로 맞추고 0.9 mL/min으로 0.5  $\mu$ L 주입하여 260 nm에서 돌연변이를 검출하였다.

## 결 과

### 1. 임상균주의 결핵균종 확인

Tbc1-TbcR5 시발체 세트는 MTB로부터 235 bp의 DNA 염기서열을 증폭하고, M5-RM3 시발체 세트는 NTM으로부터 136 bp의 DNA 염기서열을 증폭한다. 99개의 검체 중 80개가 MTM양성이고 NTM은 19개 균에서 나타났다.

MTB 양성인 것은 Fig. 1A에서 235 bp의 밴드가 보이고 Fig. 1B에서 밴드가 보이지 않으며(검체 2번-9번), NTM 양성인 것은 Fig. 1A에서 235 bp의 밴드가 없고 Fig. 1B에서 136 bp에서 밴드가 관찰된다(검체 1, 10) (Fig. 1).

### 2. PCR-RFLP법과 size based DHPLC법의 균속 동정 비교

PCR-RFLP의 결과는 김 등[14, 15]의 기준에 따라 201 bp와 61 bp에서 절편이 보이면 신속발육균, 다른 크기의 절편을 보이면 완속발육균으로 판독하여, 1개의 균만이 신속발육균이고 나





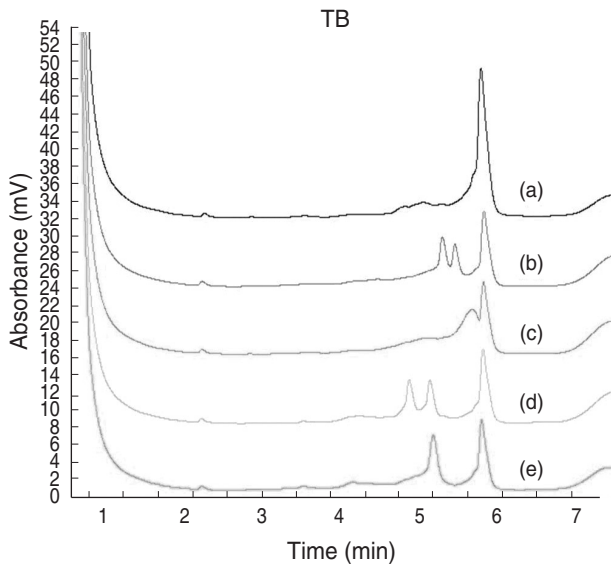


Fig. 4. DHPLC patterns of isolates to *rpoB* gene (column temperature of DHPLC: 66°C. Patterns: (a) *M. tuberculosis* H37RV, (b) 531 TCG to TTG, (c) 526 CAC to GAC, (d) 526 CAC to TGC, (e) 516 GAC to GTC).

도 일치하는 결과였다(Fig. 2, 3).

### 3. DHPLC법에 의한 *rpoB* 내성결핵균의 검출

Column oven의 온도 66°C에서 가장 좋은 분리능을 보였고, DHPLC분석 결과 *M. tuberculosis* 중 wild 형과 돌연변이 형을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 돌연변이 형의 크로마토그램은 염기서열 분석기를 사용하여 확인하였다(Fig. 5). 그 결과 9 (11%, 9/80)개의 검체에서 *rpoB* 돌연변이가 관찰되었으며, 531 코돈 TCG (serine)가 TTG (leucine)으로 치환된 것이 1균주, 526 코돈 CAC (histidine)가 GAC (aspartic acid)으로 치환된 것이 3균주, 526 코돈 CAC (histidine)가 TGC (cysteine)으로 4균주, 516 코돈 GAC (aspartic acid)가 GTC (valine)으로 1균주로 나타났다(Fig. 4, 5).

## 고 찰

결핵균속은 임상적인 중요성과 병원성 정도에 따라 절대 병원성 균인 *M. tuberculosis*와 주로 기회감염균으로 간주되는 NTM 크게 두 군으로 나눌 수 있다. 결핵균속 동정에 있어 국내와 같이 결핵 다발 지역에서는 *M. tuberculosis*와 NTM의 두 군을 감별하는 것이 중요하다.

국내에서 면역저하 환자의 급증으로 인해 점차 NTM의 감염

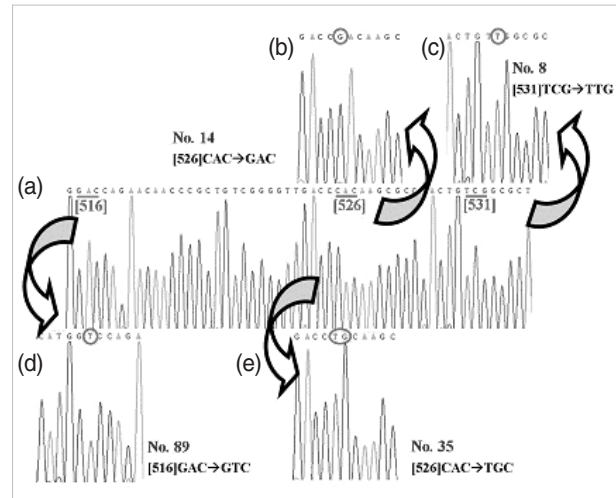


Fig. 5. Sequencing results of MDR-TB : (a) *M. tuberculosis* H37RV, (b) 526 CAC to GAC, (c) 531 TCG to TTG, (d) 516 GAC to GTC, (e) 526 CAC to TGC.

이 증가하는 추세에 있고, 또한 이들이 항결핵제에 자연 내성을 보이며, 각 균종에 따라 자연 내성이 서로 다르기 때문에 이들을 감별하는 것은 약물 선택 과정에서 매우 중요하다고 할 수 있다 [16]. 일반적인 항결핵제 내성 검사는 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 여러 약제 내성 관련 유전자를 확인하는 분자생물학적인 방법이 개발되었다. 확진 검사법인 DNA 염기서열분석법은 방법이 복잡하고 시간이 많이 걸리며 고비용이라 일반적으로 사용하기에 적합하지 않다. 따라서 많은 임상검사에서 빠르고 간단한 선별법이 요구된다. 현재 가장 일반적으로 사용되는 돌연변이 검출법에는 single strand conformation polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE), allele-specific oligonucleotide hybridization (ASO) 등이 있다 [17, 18]. 그러나 이러한 방법들은 검출감도나 실험의 재현성에서 한계를 보이고 있으며 많은 비용 및 시간 그리고 노동력이 소모된다는 단점을 가지고 있다. 최근에 이러한 단점들을 보완하고 충족시킬 수 있는 새로운 돌연변이 검출법으로써 DHPLC가 개발되었다 [19–22]. 이 분석기술은 IP-RP HPLC 방식을 이용한다 [23, 24]. PCR 방법에 의해 증폭된 이중가닥의 DNA를 고온에서 완전히 변성시켰다가 다시 천천히 식혔을 때 형성되는 이형접합체가 동형접합체(homoduplex)보다 column에서의 머무름 시간이 더 짧아지는 점을 이용하여 단 하나의 염기서열의 삽입, 제거 그리고 치환 형태의 돌연변이까지 검출할 수 있다 [25].

본 연구에서 사용된 99개의 임상균주에서 PCR법을 통해

MTB와 NTM을 구별하였다. 최근 국내에서 PCR-RFLP법으로 분리된 NTM의 분리율이 21.0-27.8%로 나타났고 본 연구에서는 20%로 나타나 비슷한 결과를 보였다[25, 26]. DHPLC를 시행하여 균속 동정과 돌연변이를 검출할 수 있었는데, 이 방법은 간편하고, 대량의 검체를 처리할 수 있고 자동화가 가능한 장점이 있다. 분석 결과는 PCR-RFLP법과 일치하였고 균종과 돌연변이에 따른 크로마토그램 형이 확실히 구분되어 전기영동법보다 육안으로 관찰하기 쉽고 감도가 뛰어난 방법으로 생각되었다. 표준균주에 대한 데이터를 구축하고 분석한다면 전기영동으로 분석할 때보다 쉽게 균 동정이 가능함을 보여줄 수 있을 뿐만 아니라 대량 검체의 검사 시 효율적으로 처리할 수 있는 자동화 시스템을 선보인 것이다.

Yip 등[27]에 의하면 *rpoB* 돌연변이를 DHPLC법으로 검출한 결과, 주요 돌연변이 형은 코돈 531 TCG (serine)가 TTG (leucine)로, 코돈 526 CAC (histidine)가 TAC (tyrosine)로 치환된 형이었고 각각 58.3%, 12.1%였다[27]. 본 연구에서는 검출률 차이는 있었으나 돌연변이 형의 크로마토그램은 비슷한 유형을 나타냈다. Telenti 등[28]은 9개의 나라에서 분리된 균주를 대상으로 연구를 시행하였는데, 코돈 531 serine이 leucine, glutamic acid, tryptopan 등으로 치환된 예가 47%, 코돈 526 histidine이 tyrosine으로 치환된 예가 12%라고 하였다. 국내보고에서 서 등[29], 이 등[11]에 의하면 코돈 531변이가 42-45%로 가장 많았고 코돈 526변이가 26-30%, 그 다음이 코돈 516, 513변이의 순으로 나타났으며, 이[30]는 코돈 531의 변이가 53.3%, 526변이 40%와 516변이 6.7%라고 보고하였다. 본 연구에서는 코돈 526변이는 78%, 코돈 531변이와 516변이는 11%로 다른 변이의 양상을 나타냈다.

본 연구에서 DHPLC를 이용한 결핵균의 동정과 약제 내성 검출은 국내에서는 처음 시도한 것이며, 통상적인 약제 내성 검사법보다 빠르고 조작이 간편하며 대량의 검체에 적용할 수 있는 자동화 시스템이라는 장점이 있다. 또한 기존의 다른 방법들에 비해 결핵균의 균종 동정에도 상당한 장점이 있는 것으로 증명되었으며, 앞으로 이들 균종 동정과 약제 내성 검사로써 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

## 요 약

**배경 :** 결핵은 세계에서 질병률과 사망률이 높은 질병이다. 다제 내성 결핵균의 증가에 따라 결핵의 확산이 동반되고 있다. 이 실험의 목적은 denaturing HPLC (DHPLC)법을 이용한 리팜핀 내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출의 유용성을 평

가하고자 함이다.

**방법 :** 본 연구에서는 Ogawa배지에 배양한 99개 균을 대상으로 하였다. 첫 번째로 PCR법으로 *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB)와 Non-tuberculous *mycobacteria* (NTM)의 *rpoB* DNA 235 bp와 136 bp를 증폭하였다. 그 후 Rif<sup>r</sup> 부분이 포함되어 있는 *rpoB* 유전자를 증폭하고(342 bp) 제한절편길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)을 이용하여 결핵균을 동정하였다. 마지막으로 증폭산물을 DHPLC법과 PCR-RFLP법으로 비교 분석하고, 염기서열분석을 시행하였다.

**결과 :** 총 99개의 결핵균 중 MTB는 81% (80/99), NTM은 19% (19/99)였다. DHPLC법과 PCR-RFLP법에 의해 NTM은 7종의 균속으로 동정하였다. DHPLC법을 이용한 *rpoB* 돌연변이는 MTB에서 11% (9/80) 검출하였다. NTM 균속 동정과 *rpoB* 돌연변이 결과는 염기서열분석을 통해 확인하였다.

**결론 :** DHPLC는 리팜핀 내성 결핵균을 신속, 간편하게 검출하고 자동화가 가능하게 하여 임상감사실에서 대량 검체 처리 시 보조적 방법으로 유용하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. Nunn P, Reid A, De Cock KM. Tuberculosis and HIV infection: the global setting. *J Infect Dis* 2007;196(S):S5-14.
2. Korea National Statistical Office. Annual report on the cause of death statistics (Based on vital registration) 2003. (통계청. 사망원인통계연보. 2003.)
3. Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE Jr. Tuberculosis in patients with human immuno-deficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991;324:1644-50.
4. Cantwell MF, Snider DE Jr, Cauthen GM, Onorato IM. Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. *JAMA* 1994;272:535-9.
5. Starke JR, Jacobs RF, Jereb J. Resurgence of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1992;120:839-55.
6. 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* 1995;171:954-60.
7. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resis-

- tance Surveillance. N Engl J Med 2001;344:1294-303.
8. Hunt JM, Roberts GD, Stockman L, Felmlee TA, Persing DH. Detection of a genetic locus encoding resistance to rifampin in mycobacterial cultures and in clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 1994;18:219-27.
  9. Donnabella V, Martiniuk F, Kinney D, Bacerdo M, Bonk S, Hanna B, et al. Isolation of the gene for the beta subunit of RNA polymerase from rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of new mutations. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11:639-43.
  10. Goble M, Iseman MD, Madsen LA, Waite 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.
  11. Lee MK, Park AJ, Jeon HS. Rapid Detection of rifampin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* using the Lind probe Assay. Korean J Clin Pathol 1997;17:269-78. (이미경, 박애자, 전희선. Line probe assay를 이용한 rifampin 내성 결핵균의 조기검출. 대한임상병리학회지 1997;17: 269-78.)
  12. Underhill PA, Jin L, Zemans R, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL. A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93: 196-200.
  13. Nam YH, Park SB, Lee JS, Kang W, Kim JG. The development of analysis system for genes related disease using chemical properties of DHPLC. Korean J Chem Soc 2006;50:116-22. (남윤형, 박상범, 이재식, 강원, 김종규. DHPLC의 화학적 특성을 이용한 질병 유전자의 분석 시스템 개발. 대한화학회지 2006;50:116-22.)
  14. Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, et al. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol 2001;39:2102-9.
  15. Kim BJ, Hong SK, Lee KH, Yun YJ, Kim EC, Park YG, et al. Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol 2004;42:1308-12.
  16. Kam KM and Yip CW. Surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Hong Kong, 1986-1999, after the implementation of directly observed treatment. Int J Tuberc Lung Dis 2001;5: 815-23.
  17. Xiao W and Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. Hum Mutat 2001;17:439-74.
  18. Skopek TR, Glaab WE, Monroe JJ, Kort KL, Schaefer W. Analysis of sequence alterations in a defined DNA region: comparison of temperature-modulated heteroduplex analysis and denaturing gradient gel electrophoresis. Mutat Res 1999;430:13-21.
  19. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, et al. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. Clin Chem 1999;45: 1133-40.
  20. Yip CW, Leung KL, Wong D, Cheung DT, Chu MY, Tang HS, et al. Denaturing HPLC for high-throughput screening of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10:625-30.
  21. Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T, et al. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. Genomics 1999;62:369-76.
  22. Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. Hum Mutat 2000;15:556-64.
  23. Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M. Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. Hum Mutat 2000;16:345-53.
  24. Nickerson ML, Weirich G, Zbar B, Schmidt LS. Signature-based analysis of MET proto-oncogene mutations using DHPLC. Hum Mutat 2000;16:68-76.
  25. Benit P, Kara-Mostefa A, Berthelon M, Sengmany K, Munnich A, Bonnefont JP. Mutation analysis of the hamartin gene using denaturing high performance liquid chromatography. Hum Mutat 2000; 16:417-21.
  26. Lee JY, Choi HJ, Lee HY, Joung EY, Huh JW, Oh YM, et al. Recovery rate and characteristics of nontuberculous mycobacterial isolates in a university hospital in Korea. Tuberc Respir Dis 2005;58:385-91. (이정연, 최희진, 이해영, 정은영, 허진원, 오연목 등. 한 대학병원에서 비결핵항산균의 분리 및 동정실태. 결핵 및 호흡기질환 2005;58:385-91.)
  27. Yip CW, Leung KL, Wong D, Cheung DT, Chu MY, Tang HS, et al. Denaturing HPLC for high-throughput screening of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10:625-30.
  28. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647-50.

29. Suh JT, Kim MH, Choi JW, Lee HJ, Kang HM. Direct sequencing for *rpoB* gene in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Korean J Clin Pathol 1996;16:78-90. (서진태, 김문희, 최종원, 이희주, 강홍모. *Mycobacterium tuberculosis*의 rifampin 내성과 관련된 *rpoB* 유전자 염기서열분석. 대한임상병리학회지 1996;16:78-90.)
30. Lee MA. Direct detection of rifampin-resistant mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction and line probe assay in sputums. Korean J Clin Pathol 1998;18:71-6. (이미애. 객담에서 중합효소 연쇄반응과 Line Probe Assay를 이용한 Rifampin 내성결핵균의 직접 검출법. 대한임상병리학회지 1998;18:71-6.)