

□ 원 저 □

pncA 유전자 PCR-SSCP법을 이용한 결핵균 Pyrazinamide 내성의 진단

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실, 서울대학교 내과학교실*

심태선, 김영환*, 진재용, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김동순, 김원동

= Abstract =

Detection of Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-SSCP of *pncA* Gene

Tae Sun Shim, M.D., Young Whan Kim, M.D.,* Jae Yong Chin, M.D.,
Chae-Man Lim, M.D., Sang Do Lee, M.D., Younsuck Koh, M.D.,
Woo Sung Kim, M.D., Dong Soon Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Asan Medical Center,
University of Ulsan, College of Medicine, *Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Recently the incidence of tuberculosis is increasing in many countries and control of the disease is further threatened by the emergence of multi-drug resistant tuberculosis. So rapid detection of drug resistance is very important. Pyrazinamide (PZA) is a first-line chemotherapeutic agent for tuberculosis. Now in Korea, we perform PZase activity test instead of actual pyrazinamide susceptibility test for the detection of PZA resistant *M. tuberculosis*. Recently the *pncA* gene, encoding the PZase of *M. tuberculosis*, was completely sequenced. And it was reported that the mutation of *pncA* gene would be associated with PZA resistance of *M. tuberculosis*. Therefore we performed this study to evaluate the possibility for the rapid detection of PZA resistant *M. tuberculosis* using PCR-SSCP of *pncA* gene.

Method : 44 cultured clinical isolates of *M. tuberculosis*, BCG Tokyo strain, BCG French strain, and one *M. bovis* isolate were studied. We used H37Rv as the reference strain, The PZase activity test was done at the reference laboratory of Korean Tuberculosis Institute. DNA was extracted by bead-beater method and 561 bp fragment including *pncA* gene was amplified by PCR. The PCR product were digested by BstB I enzyme. SSCP was done using MDE gel. Of the 44 strains of *M. tuberculosis*, 22 strains were PZase-positive and other 22 strains were PZase negative.

Results : Of the 22 PZase positive strains, 18 strains(82%) showed the same mobility compared with that of H37Rv and 4(18%) showed different mobility. Of the 22 PZase-negative strains, 19(86%) strains showed the

same mobility pattern compared with that of H37Rv and 3(14%) showed different mobility. Naturally PZA-resistant BCG-French strain, BCG-Tokyo strain, and one *M. bovis* isolate showed the same band pattern each other, but their mobility were different from that of H37Rv. The results of PZase activity test and PCR-SSCP of *pncA* of *M. tuberculosis* were statistically significantly correlated each other ($p < 0.01$).

Conclusion : The PCR-SSCP after BstB I restriction of *pncA* gene of *M. tuberculosis* may be a useful method for the rapid detection of PZA-resistant *M. tuberculosis*. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 1178-1187)

Key words : Tuberculosis, Pyrazinamide, Drug resistance, SSCP, PCR.

서 론

세계적으로 지속적인 감소추세를 보이던 결핵의 유병률이 1980년대 후반부터 다시 증가하기 시작하였다. 이는 주로 HIV 감염과 연관되며 또한 다제약제내성 결핵의 증가와 밀접한 관련이 있다. 한편 우리나라에서는 흉부방사선 소견상 폐결핵 유병률이 5.1% (1965)에서 1.0% (1995)로 꾸준히 감소하여 왔지만 아직도 전국에는 약 40만명 이상의 결핵환자가 있을 것으로 추정되어 국민건강에 큰 문제가 되고 있다¹⁾. 외국과는 다르게 아직 국내의 HIV 감염률은 높지 않지만 HIV 감염과 무관하게 Isoniazid (INH) 내성이 9.2% (1995), INH와 Rifampicin (RFP) 동시내성인 다제내성이 5.3%, Pyrazinamide (PZA) 내성 2.3%, 그리고 INH, RFP, PZA 동시내성이 2.3%에 이를 정도로 높은 내성률을 보여주고 있다¹⁾. 그러므로 감수성의 신속한 진단이 필수적임에도 불구하고 현재는 균의 배양에 4-6주가 소요되고 감수성검사에 2-4주가 소요되는 실정이다.

PZA는 1950년대에 처음으로 항결핵효과가 있는 것으로 밝혀졌으나 초기치료에는 사용되지 않다가, 현재는 INH, RFP, Ethambutol (EMB)과 함께 4제병용 단기요법에 사용되고 있다. PZA는 대식세포내와 같은 산성환경에서 결핵균의 pyrazinamidase에 의하여 pyrazinoic acid로 분해되며, 이 pyrazinoic acid가 항결핵효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러므로 pyrazinamidase 활성도가 없으면 pyrazinoic acid가 생성되지 않으므로 PZA 내성이 되고²⁾, 따라

서 pyrazinamidase 활성도 유무로 PZA에 대한 내성여부를 판별하고 있다. 최근 Scorpio 등 (1996)은³⁾ PZase를 코딩하는 *pncA* 유전자의 염기서열을 밝혀내었다. 또한 PZA 내성이며 PZase 활성도 음성인 8균주 모두에서 *pncA* 유전자의 돌연변이를 확인함으로써 *pncA* 유전자의 돌연변이가 PZA 내성의 주 원인임을 보고하였다³⁾.

따라서 본 연구에서는 PCR-SSCP법을 이용하여 *pncA* 유전자의 돌연변이와 PZA 내성과의 관련성을 규명하고자 노력하였고 또한 SSCP법을 이용하여 PZA 내성을 신속하게 진단할 수 있는지 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대 상

환자의 객담 검체에서 배양된 후 대한결핵연구원에서 PZase 활성도가 확인된 44예의 결핵균주와 대한결핵연구원에서 공여받은 BCG-French strain, BCG-Tokyo strain, 그리고 1예의 우형결핵균 배양검체를 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) 결핵균 DNA의 추출

배양된 균을 면봉으로 3차중류수에 부유한 후, 85℃에서 30분간 가열하였다. 1.5ml microcentrifuge

tube에 결핵균 부유액 200 μ l 를 넣은 후, 0.1mm zirconium Bead 200 μ l, TEN 용액 100 μ l, phenol/chloroform/isoamyl alcohol 용액 200 μ l 를 혼합한 후 mini-Bead beater로 3분간 처리하여 세포를 파괴함과 동시에 단백질을 변형시켰다. 검체를 3000rpm으로 5분간 원심분리한 후, 상층액 200 μ l 를 다른 microcentrifuge tube에 옮기고 Chloroform/isoamyl alcohol 용액 200 μ l 를 넣고 3000rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 다른 microcentrifuge tube에 옮겼다. 상층액 100 μ l 를 취하여 3M sodium acetate 10 μ l 와 100% 냉동 ethanol 200 μ l 를 넣고, -70℃ 냉동고에 15분 방치하였다. 10000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액을 진공흡인을 이용하여 제거하고, 공기중에서 완전히 건조시켰다. 추출된 DNA는 멸균 3차 증류수 100 μ l 에 용해시켜서 -20℃에 보관하였다.

2) 중합효소연쇄반응

GeneAmp System 9600 thermocycler (Perkin ELMER Corp., Foster City, Calif. USA)을 이용하였고 반응액은 Korea Biotech. Inc. 사의 20 μ l 용 PCR Pre-Mix kit을 이용하여 *pncA* 유전자 (558bp)를 포함하는 561bp 분절을 증폭하였다. 10pmole/ μ l 의 *pncA*-1과 *pncA*-2 primer를 각각 1 μ l 씩 넣고 [α -³²P]-dCTP 0.1 μ l (1uCi), DNA 1 μ l 넣은후 16.9 μ l 의 증류수를 넣어서 최종 20 μ l 가 되게 한 후 95℃에서 5분간 반응시킨 후 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분씩 35주기를 반복 시행하고, 72℃에서 5분간 반응 시킨 뒤 종료하였다. 또한 [α -³²P]-dCTP를 넣지 않고 같은 조건에서 중합효소연쇄반응을 시행한 후 agarose gel에서 전기영동하여 561bp 분절이 317bp와 244bp 분절로 완전히 절단된 것을 확인하였다.

3) BstB I 제한효소에 의한 절단

BstB I 제한효소 (Biolabs, Beverly, USA)는 TT▼CGAA를 인지하며 *pncA* 유전자를 포함한 561bp 분절을 244bp 분절과 317 bp 분절로 절단한

다. 위의 중합효소연쇄반응물 5 μ l 에 BstB I 제한 효소 1 μ l (12.5unit/ μ l)와 buffer(x10) 4 μ l 를 넣은 후 65℃에서 3시간 반응시켰다. 위의 중합효소 연쇄반응시 동위원소를 포함하지 않은 반응물을 agarose gel에서 전기영동하여 561bp 분절이 317bp와 244bp 분절로 완전히 절단된 것을 확인하였다.

4) PCR-SSCP

젤의 농도와 전기영동 조건을 바꾸면서 밴드의 구분이 제일 뚜렷한 조건을 선택하여 SSCP를 시행하였다. 0.75배의 MDE gel과 0.6배의 TBE buffer를 함유하는 75ml에 TEMED 30 μ l 와 10% ammonium persulfate 300 μ l 를 섞어 gel을 만들었다. 동위원소가 들어있는 중합효소연쇄반응 산물중 1 μ l 를 취하여 SSCP loading 용액 2 μ l 와 섞어 95℃에서 5분간 가열 시킨뒤 즉시 얼음에 넣어서 5분간 보관한 뒤에 3 μ l 를 loading하고 6watt에서 16시간동안 실온에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 유리판을 분리하여 gel을 3M paper에 붙여서 wrap으로 싸운뒤 80℃에서 2시간동안 gel을 건조시킨 후 X-ray film 을 cassette에 넣고 -70℃에서 12시간 동안 autoradiography를 시행하였다.

5) BstE II 제한효소에 의한 절단

Scorpio 등(1996)에 의하면 *M. bovis*의 *pncA* 유전자는 169번째 염기가 C에서 G로 돌연변이가 있다. BstB II 제한효소는 G▼GTGACC를 인식하는데 *M. bovis* 균주는 GGTGACG로 돌연변이가 존재하므로 절단되지 않는다. 동위 원소를 포함하지 않은 결핵균과 우형결핵균의 561bp의 중합효소연쇄산물 5 μ l 에 BstB III 제한효소 1 μ l (12.5unit/ μ l)와 x10buffer 4 μ l 를 넣고 65℃에서 3시간 반응시킨 후 agarose gel에서 전기영동을 시행하여 인형결핵균과 우형결핵균의 분절의 양상을 비교하였다.

6) 사용된 primers

사용된 primer는 다음과 같으며 Korea Biotech. Inc.에 의뢰하여 제조하였다.

Table 1. Comparison of the results of SSCP analysis of *pncA* gene of *M. tuberculosis* between PZase-negative and PZase-positive groups.

	PZase-positive	PZase-negative	
SSCP(+)	4	19	23
SSCP(-)	18	3	21
	22	22	44

The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive values of PCR-SSCP methods are 86%, 82%, 83%, and 86%, respectively, if we consider the traditional PZA susceptibility test as the gold standard diagnostic method of detecting PZA resistance.

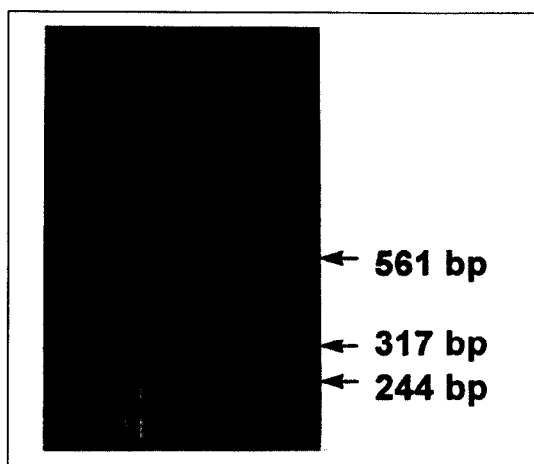


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of *pncA* gene after BstB I digestion. The PCR product is 561 bp fragment. After incomplete digestion, 561, 317, and 244 bp fragments were seen.

PncA-1 : 5' -ATG CGG GCG TTG ATC ATC GT-3' (20 mer)

PncA-2 : 5' -TCA GGA GCT GCA AAC CAA CT-3' (20 mer)

결 과

44예의 결핵균중 22예는 PZase 양성(PZA 감수성)이었고 22예는 PZase 음성(PZA 내성)이었다. 감수성 22예중 18예(82%)에서 표준균주인 H37Rv와 동일한 band의 이동성을 보였고 4예는 다른

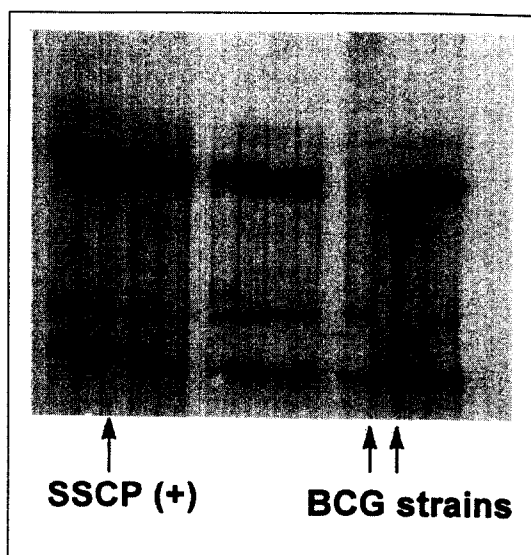


Fig. 2. PCR-SSCP results of *pncA* gene after BstB I restriction. Naturally PZA resistant BCG Strains showed the different mobility compared with that of reference strain H37Rv. The SSCP(+) lane showed the different mobility compared with that of H37Rv and turned out to be PZase negative.

band의 이동성을 보였다. 내성균주 22예중 19예(86%)에서 표준균주인 H37Rv와 다른 band의 이동성을 보였고 3예는 H37Rv와 동일한 band의 양상을 보여서 두 검사방법간의 관련성 검증결과 통계적으로 유의하였다(Table 1, Fig. 1, $p < 0.01$). 근본적으로 PZA에 내성을 갖는 BCG strains과 1예의 우형결핵균 모두 H37Rv와 다른 band의 양상을 보여주었다

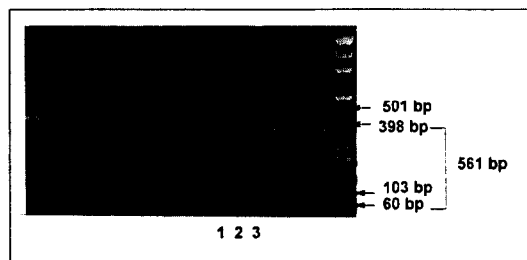


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of *pncA* gene of *M. tuberculosis* and *M. bovis* after BstE II digestion. The PCR products of *M. tuberculosis* isolates showed the 398bp and 103bp segment. But *M. bovis* lacked these two bands. Instead they showed the 501 bp fragment(sum of 398 and 103) because they were not digested by BstE II enzyme. These results meant that naturally PZA resistant *M. bovis* strains have *pncA* gene mutation, and these restriction analysis easily differentiates between *M. tuberculosis* and *M. bovis* strains. 1 : BCG Tokyo strain. 2 : BCG French strain. 3 : *M. bovis* isolate. other lanes : *M. tuberculosis* isolates.

(Fig. 2). 우형결핵균은 자연적으로 *pncA* 유전자의 돌연변이를 갖고 있기 때문에 이 부위를 절단하는 BstB II 제한효소에 의한 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)법에 의하여 인형결핵균과 쉽게 구분이 가능하였다(Fig. 3).

고 찰

INH, RFP, 그리고 PZA가 포함된 단기요법이 가능하게 되고 국가적인 결핵 퇴치사업과 생활수준의 향상으로 결핵의 유병율은 계속 감소추세에 있었다. 그러나 1980년대 후반부터 서구에서는 AIDS의 증가와 함께 결핵의 유병율이 다시 급속하게 증가하였고 특히 다제약제내성균주의 증가가 큰 문제로 대두되었다. 특

히 우리나라에서는 INH 내성이 9.2%(1995년), INH와 RFP 동시내성인 다제약제내성이 5.3%, PZA 내성이 2.3%, 그리고 INH, REF, PZA 동시내성이 2.3%에 이를 정도로 HIV 감염과 관련 없이 과거부터 높은 약제내성율을 보여왔으며, 최근 국내에서도 HIV 감염이 증가추세에 있으므로 약제내성결핵균이 더욱 증가할 가능성이 있다.

약제내성의 진단에 오랜 시간이 걸리므로 지속적인 감염원이 된다는 점이다. 현재로서는 치료중 또는 치료전에 약제내성이 밝혀지면 치료약제를 바꾸는 소극적인 대처가 유일한 방법이다. 그러나 통계에서 보는 바와 같이 한 가지 약제에 내성이면 다른 약제에도 동시에 내성인 경우가 많고, 현재 임상에서 사용가능한 항결핵약제는 10여종에 불과하나 결핵은 균의 특성상 최소 3-4종이상의 약제를 동시에 투여하는 다제병용요법이 원칙인 실정을 감안하면 일단 결핵균이 내성을 획득하거나 약제내성균에 감염되면 완치의 가능성은 떨어진다고 할 수 있다. 그러나 전통적인 감수성검사 방법은 배양에 4-6주가 걸리고 감수성검사에 2-4주가 걸릴 정도로 오랜 시간을 필요로 한다. 따라서 약제내성을 신속하게 진단하고 극복할 수 있는 적극적인 치료법의 개발이 시급히 요청되고 있다. 이를 위해서는 항결핵약제들의 정확한 작용기전과 내성의 기전에 대한 연구가 필수적이다.

최근 분자생물학의 발전으로 일부 항결핵약제의 내성획득기전이 분자생물학적 수준에서 밝혀지고 있다. 즉, INH 내성획득에는 *katG*⁴⁾, *inhA*⁵⁾, 그리고 *ahpC*^{6,7)}등의 유전자 돌연변이가 관여하고, RFP 내성획득은 *rpoB*⁸⁾ 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 밝혀졌다. 또한 streptomycin 내성에는 *rspl* 유전자와 *rrs* 유전자^{9,10)}, fluoroquinolone의 내성에는 *gyrA*, *gyrB*, 그리고 *lfrA* 유전자¹¹⁻¹³⁾, pyrazinamide 내성에는 *pncA*³⁾ 유전자, 그리고 ethambutol 내성에는 *embCAB* gene cluster¹⁴⁾의 돌연변이가 관여됨이 보고되고 있다.

Pyrazinamide(PZA)는 산성조건하에 있는 결핵균에 대하여 살균작용을 나타내는 항결핵약제로서 과

거에는 간독성등의 부작용 때문에 이차적으로 사용되던 약제였으나 현재는 1차약제로서 4제병용단기화학요법의 중요한 약제이다. PZA는 균이 가지고 있는 pyrazinamidase에 의하여 pyrazinoic acid의 작용기전에 대하여는 아직 알려진 바 없다. PZA에 대한 감수성검사는 pyrazinoic acid의 작용을 위한 적절한 산성환경과 결핵균이 성장하기 위한 적절한 pH의 조절이 어렵다. 따라서 현재 우리나라에서도 PZA 감수성검사 대신에 PZase 활성도여부를 봄으로써 PZA 감수성여부를 대신 판별하고 있다. 배동¹⁵⁾에 의하면 항결핵치료의 병력이 없는 176예를 대상으로 하였을 때 PZA 감수성 161예중 148예(91.9%)에서 PZase 활성도가 양성이었고 PZA 내성 15예중에서 15(100%)에 모두에서 PZase 활성도 음성이었다. 그렇지만 다양한 pH(4.65, 4.85, 5.05)에서 결핵균을 배양하면서 검사를 시행하였을 때 3가지 pH조건에서 모두 자라고 PZA에 감수성인 121예중 101예(83.5%)에서 PZase 활성도가 양성이었고, 3가지 pH에서 모두자란 PZA내성 30균주중 24예(80%)에서 PZase 활성도 음성이었다. 낮은 pH에서는 감수성이고 높은 pH에서는 내성인 18예중 8예는 PZase 활성도음성이고, 10예는 PZase 활성도 양성이었다. 그러나 pH 4.85 이상에서만 자란 64균주중 PZA 내성균주의 85.7%에서 PZase 활성도 음성이었고, pH 5.05 이상에서만 자란 PZA내성 11균주중 7예(63.6%)에서만 PZase 활성도 음성이었다. 이상의 결과는 PZase 활성도와 PZA 감수성검사 결과와는 어느정도 일치함을 보여주지만 pH의 변화에 따라서 감수성결과와 PZase 활성도결과가 차이가 있으므로 전통적인 감수성검사와 PZase 활성도검사의 한계성을 보여준다.

Scorpio 등은(1996) 결핵균의 pyrazinamidase를 coding하는 *pncA* 유전자의 염기서열을 처음 밝혀내어 보고하였다. 또한 PZA 내성이고 PZase 활성도가 없는 결핵균에 PZA에 감수성인 결핵균의 *pncA* 유전자를 이입하여 PZA 감수성과 PZase 활성도를 획득함을 보여주었다. PZA 감수성인 3균주

모두 *pncA* 유전자의 돌연변이가 없었고 PZA 내성인 5균주 모두 *pncA* 유전자의 돌연변이가 관찰되어 *pncA* 유전자의 돌연변이가 PZA 내성에 관여할 것이라고 보고하였다. 기본적으로 PZA 내성인 BCG strain이나 유형결핵균은 모두 169번째 염기가 CAC(histidine)에서 GAC(aspartic acid)로 점돌연변이가 발견되어 이 또한 *pncA* 유전자의 돌연변이가 PZA 내성에 관여하리라는 증거가 된다. 이 후 Scorpio(1997)등은¹⁶⁾ PZA 내성인 38균주중 33균주에서 *pncA* 유전자 돌연변이가 있음을 밝혀내었다. 또한 나머지 5균주중 4균주는 PZA 위내성(false-resistant)균주이었고 이들 모두 PZase 활성도 양성이었다. 다만 1균주만 PZA에 약한(MIC=100-200 µg/ml) 내성을 보여주었고 PZase 활성도 음성이어서 다른 내성기전의 가능성을 제시하여 주었다. 그러나 이 균주도 pyrazinoic acid에는 감수성을 보였다. Hirano(1998)등은¹⁷⁾ pH 6.0에서 PZA에 대한 MIC가 400 µg/ml 이상이며 PZase 음성인 33균주와 PZase 양성이고 PZA에 대한 MIC가 200 µg/ml 이하인 135균주를 대상으로 *pncA* 유전자의 돌연변이 양상을 관찰하였다. PZase 양성인 135균주 모두 *pncA* 유전자의 돌연변이는 없었으며 PZase 음성인 33균주 중 32균주(97%)에서 *pncA* 유전자의 돌연변이를 관찰하여 *pncA* 유전자의 돌연변이가 PZA 내성의 주 원인임을 강력하게 시사하였다. 한편 Sreevatsan 등(1997)은¹⁸⁾ PZA 내성균주중 28%에서는 *pncA* 유전자의 돌연변이를 발견할 수 없었고 보고하였다. Martiniuk 등은¹⁹⁾ 160임상검체를 대상으로 하여 명백하게 PZA 내성인 4균주에서 allele specific oligonucleotide(ASO) hybridization 방법으로 돌연변이 여부를 확인하였는데 모두에서 돌연변이를 발견할 수 없었다.

또한 Scorpio(1997) 등은¹⁶⁾ PZA의 target의 변화가 내성의 원인이 되는지를 알아보기 위하여 pyrazinoic acid에 내성인 균주를 찾기 위하여 노력하였으나 실패하였다. 이렇게 PZA의 target의 변화에 의한 PZA 약제내성이 없는 이유는 아마도 PZA

target의 변화는 결핵균이 살기 어려울 정도의 치명적인 변화를 주는 것이 아닌가 생각된다. 어쨌든 지금까지의 관찰로는 PZA가 pyrazinoic acid로 변화되지 못하는 것이 결핵균의 PZA 내성의 가장 중요한 기전으로 생각되며, 그러므로 PZase 활성도 여부가 중요하다.

본 연구에서는 결핵균 *pncA* 유전자의 돌연변이 유무를 확인하는데 PCR-SSCP(Single Strand Conformational Polymorphism) 법을 이용하였다. PCR-SSCP 법은 non-denaturing polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 시행하는데, 같은 크기의 DNA 분절이라도 염기서열의 차이에 따라 이동성의 차이를 나타낸다. 그러므로 점돌연변이로 1개의 염기만 바뀌어도 DNA의 구조적변화(conformational change)를 일으켜서 돌연변이를 일으키지 않은 같은 크기의 DNA 분절과 이동성의 차이를 보이므로 돌연변이 여부를 쉽게 구분할 수 있는 방법이다. 좋은 결과를 위해서는 겔의 성분 및 전기영동의 조건이 중요한데 이를 위하여 여러가지 다른 농도(MDE 겔, 0.5-1배)와 조건에서 전기영동을 시행하여 밴드의 구분이 제일 뚜렷한 조건을 선정하여 SSCP를 시행하였다. 심등은²⁰⁾ 이 방법을 이용하여 RFP 내성 결핵을 신속하고 간편하게 확인할 수 있음을 보고하였다. 그러나 SSCP 법은 200-300bp 이하의 작은 분절에서만 돌연변이의 구분이 가능하다. 따라서 *pncA* 유전자의 돌연변이를 보기 위하여는 *pncA* 유전자를 여러 분절로 나누어 증폭할 수 있도록 여러개의 primer를 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하여 각각 따로 SSCP 법을 시행할 수 있다. 아니면 직접 염기서열결정법을 이용하여 돌연변이를 확인할 수 있다. 그러나 이 연구의 특징은 *pncA* 유전자의 PCR 산물을 BstB I 제한효소로 절단한 후 바로 SSCP를 시행하여 과정을 간편화 한 점이다. 물론 아직 *pncA* 유전자의 돌연변이가 PZA 내성 결핵균의 100%에서 발견되는 것은 아니지만 Scorpio 등(1996)의 보고에 의하면 *pncA* 유전자의 돌연변이가 PZA 내성의 주 원인으로 여겨지며, 이를 임상에

적용하기 위해서는 간편하게 돌연변이를 확인할 수 있는 방법의 개발이 중요하다. 본 연구결과에서는 총 44예의 결핵균주에서 PZase 활성도 양성(감수성) 22예중 4예(18%)에서만 *pncA* 유전자의 돌연변이를 발견하였고, PZA 활성도 음성(내성)균주 22예중 19예(86%)에서 *pncA* 유전자의 돌연변이를 발견하여 두 검사방법의 결과의 일치성에 대한 검증결과 통계적으로 유의하였다($p < 0.01$). 그러나 PZase 활성도 양성이면서도 SSCP에서 돌연변이를 보여준 4예와 PZase 활성도 음성이면서 SSCP에서 돌연변이를 확인하지 못한 3예, 즉, PZA 활성도검사와 *pncA* 유전자의 SSCP법의 결과가 불일치한 예가 있으므로 이들에 대해서는 추후 더 자세한 검사가 필요하리라 생각된다. 가능한 설명으로 PZA 활성도 검사가 잘못 되었을 경우, SSCP 겔의 성분이나 전기영동의 조건을 최적화하지 못했을 경우, *pncA* 유전자의 돌연변이외의 다른 내성의 기전이 존재할 경우들을 들 수 있겠다. 그러므로 우선적으로 두 검사결과가 불일치한 검체를 대상으로 *pncA* 유전자의 염기서열을 확인하여야 하며, 차후 더 많은 수의 균주를 대상으로 *pncA* 유전자의 돌연변이의 다양한 양상을 확인하여야 하겠다. Scorpi(1997) 등은 3쌍의 primer를 이용하여 PCR-SSCP를 시행하였는데 PZA 감수성 10균주 모두에서 표준균주와 동일한 양상을 보였고, PZA 내성균에서 SSCP법으로 돌연변이를 확인할 수 있다고 발표하였으나 몇 예를 대상으로 하였는지, 그리고 어느정도에서 돌연변이를 확인할 수 있었는지에 대하여는 자세한 기술이 없었다.

또한 *pncA* 유전자는 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*의 구별에 유용하다. *M. bovis*에 의한 감염이 많은 지역에서는 두 균주를 구별함으로써 PZA가 치료에 사용할 것인가가 달라지며, 또한 두 균주의 구별은 역학연구에서도 중요하다. 현재는 여러가지 생화학적 인사를 이용하여 구분하고 있으나 시간이 오래 걸리고 힘든 작업이다. 그러나 분자생물학적으로 *M. bovis*는 *pncA* 유전자의 169번째 염기가 C에서 G(histidine에서 aspartic acid)로 돌연변이가 있으므로

로 쉽게 구분할 수 있다. Scorpi등(1997)은 *pncA* 유전자의 169번째 염기를 포함하는 부분을 중합효소 연쇄반응으로 증폭하여 PCS-SSCP법으로 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*를 구분하였다. 89 *M. bovis* 균주를 대상으로 하였는데 87균주는 SSCP로 *M. tuberculosis*와 구분이 가능하였다. 구분이 안된 2균주는 원래는 *M. bovis* 균주로 알았는데 추후에 *M. africanum*으로 밝혀졌다. *M. africanum*은 PZase 양성이고 근본적으로 wild-type의 *pncA* 유전자를 갖고있다. Sreevatsan(1997)등은 10균주 중 8균주의 *M. bovis*에서 *pncA* 유전자의 169번째 염기의 돌연변이를 관찰하였다. 본 연구에서도 본래부터 PZA에 내성인 BCG strains과 1예의 우형결핵균 모두 SSCP를 이용하여 돌연변이가 있음을 확인하였다. 또한 더욱 간편한 방법인 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)을 이용하여 *M. tuberculosis*와 *M. bovis*를 구별할 수 있는 방법을 개발하였다는 점에서 의미가 있다.

결론적으로 결핵균의 PZase를 coding 하는 *pncA* 유전자를 이용한 PCR-SSCP법은 PZA 내성을 진단하는 한 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이전에 *pncA* 유전자의 염기서열결정법 등을 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

연구배경 :

Pyrazinamide(PZA)는 대식세포(macrophage)내의 결핵균에 주로 작용하는 항결핵약제로서 단기화학요법의 중요한 요소이다. 최근 서구에서 AIDS 발생의 증가와 함께 약제내성 결핵의 발생이 증가하면서 약제내성을 조기에 발견하려는 노력이 시도되고 있다. 현재 우리나라에서는 PZA 감수성 검사 대신에 pyrazinamidase(PZase) 활성도 유무로 PZA에 대한 내성여부를 판별하고 있다. 최근 결핵균의 PZase를 coding하는 *pncA* 유전자가 밝혀졌고 이 유전자의 돌연변이가 결핵균의 PZA 내성에 관여한다는 보

고가 있었다. 이에 본 연구자는 결핵균의 *pncA* 유전자를 대상으로 한 PCR-SSCP법으로 PZA 내성여부를 진단할 수 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

환자에서 추출되어 배양후 대한결핵연구원에서 PZase 활성도가 확인된 44예의 결핵균주와 대한결핵연구원에서 공여받은 BCG-French Strain, BCG-Tokyo strain, 그리고 1예의 우형결핵균 배양검체를 대상으로 하였다. 검체에서 bead beater법으로 DNA를 추출하였으며 *pncA* 유전자를 포함하는 561bp 분절을 중합효소연쇄반응으로 증폭하였다. 이 증폭된 DNA를 BstB I 제한효소로 절단한 후 폴리 아크릴아마이드젤에서 SSCP를 시행하여 그 결과를 표준균주 H37Rv와 비교하였다.

결 과 :

44예의 결핵균 중 22예는 PZase 활성도 양성이고 22예는 PZase 활성도 음성이었다. 양성 22예중 18예(82%)에서 표준균주인 H37Rv와 동일한 band의 이동성을 보였고 4예는 다른 band의 이동성을 보였다. 음성균주 22예중 19예(86%)에서 H37Rv와 다른 band의 이동성을 보였고 3예는 H37Rv와 동일한 band의 양상을 보여서 두 검사방법간의 관련성 검증 결과 통계적으로 유의하였다($p < 0.01$). 근본적으로 PZA에 내성을 갖는 BCG strains과 1예의 우형결핵균 모두 H37Rv와 다른 band의 양상을 보여주었다.

결 론 :

결핵균의 PZase를 coding하는 *pncA* 유전자를 이용한 PCR-SSCP법은 PZA 내성의 진단방법으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부 대한결핵협회. 제7차 전국 결핵실태조사결과. p13, 1995
2. Konno K. Feldmann FM. McDermott W: Pyrazinamide susceptibility and amidase activity

- of tuvercle bacilli, American Review of Respiratory Disease. 95 : 461, 1967
3. Scorpio A., Zhang Y : Mutaitons in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacilli, Nature Med. 2(6) : 662, 1996
4. Zhang Y, Heym-B, Allen B, Young D, Cole ST : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, Nature 358 : 591, 1992
5. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um K S, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs W R : inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*, Science 263 : 227, 1994
6. Sherman DR. Mdluli K. Hickey MJ. Arain TM. Morris SL. Barry CE 3rd Stover CK : Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Science 272(5268) : 1641, 1996
7. Wilson TM, Collins DM : *ahpC*, a gene invoved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Mol Microbiol. 19 : 1025, 1996
8. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston M J, Matter L, Schopfer K & Bodmer T : Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, Lancet 341 : 647, 1993
9. Honore N, Cole ST : Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. Antimicrob Agents Chemother 37(3) : 414, 1993
10. Nair J. Rouse DA, Bai GH, Morris SL : The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, Mol-Microbiol 10(3) : 521, 1993
11. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, Telenti A : Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations, Antimicrob Agents Chemother. Apr ; 38 (4) : 773, 1994
12. TakiffHe, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, Salazar L, Bloom BR, Jacobs WR Jr : Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93 : 362, 1996
13. Kocagoz T, Hackbarth CJ, Unsal I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF : Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, Antimicrobial Agents & Chemotherapy 40 : 1768, 1996
14. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wiele B, Musser JM, Jacobs WR Jr : The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol, Nature Med 3 : 567, 1997
15. 배길한, 김상재 : Pyrazinamide 약제감수성검사 방법 개선에 관한 연구, 결핵 및 호흡기 질환 30 : 103, 1983
16. Scorpio A., Lindholm-Levy p, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y : Charicterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicr Agent Chemother 41 : 540, 1997
17. Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa

- Y, Abe C : Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Tubercle and lung disease* 78 : 117, 1998
18. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM : Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms, *Antimicrob Agent Chemother* 41 : 636, 1997
19. Martiniuk F, Chen A, Mack A, Bonk S, Hanna B, Donnabella V, Birmingham B, Rom WN : Screening Drug Resistant TB for Mutations at the Putative PZA Resistant Gene, *Am J Respir Crit Care Med* 155 : A554, 1997
20. 심태선, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수 : 결핵균의 *rpoB* 유전자 PCR-SSCP법에 의한 Rifampicin 내성의 신속진단, *결핵 및 호흡기질환* 43 : 842, 1996
-