

역교잡반응법을 이용한 아이소니아지드 및 리팜피신 신속감수성검사

결핵연구원

박영길, 유희경, 류성원, 배길한

=Abstract=

Rapid Drug Susceptibility Testing for Isoniazid and Rifampicin by Reverse Hybridization Assay

Young Kil Park, Ph.D., Hee Kyoung Yu, B.S.,
Sung Weon Ryu, M.S., Gill Han Bai, Ph.D.

Korean Institute of Tuberculosis, Seoul, Korea

Background : Development of rapid drug susceptibility testing provides the opportunity for rapid identification of individuals with drug resistant tubercle bacilli, allowing selection of appropriate therapeutic regimens.

Methods : A total of 502 drug resistant isolates were subjected to reverse blot hybridization assay to detect mutations within genes (*rpoB*, *katG*, *inhA*, and *ahpC*) associated with rifampicin (RMP) and isoniazid (INH) resistance.

Results : Among the 264 RMP resistant strains (RMP^R) tested, the most prevalent mutation was the Ser531Leu seen in 121 strains (46%). The second common mutation occurred in 84 strains (32%) at codon 526. And 27 strains (10%) showed the mutation at codon 516. Among all 469 INH resistant strains (INH^R), the *katG* mutation was responsible for INH. The *inhA* mutation was present in 88 strains (19%). In 11 isolates (2%), coexisting of the *katG* and *inhA* mutations were identified. Reverse hybridization assay successfully detected over 80% of INH^R and over 92% of RMP^R among Korean isolates.

Conclusion : Reverse hybridization was useful for rapid detection of INH^R and RMP^R. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 55:440-448)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Korea, Beijing family, genotypes, *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*

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

Address for correspondence :

Gill Han Bai Ph.D.

Korean Institute of Tuberculosis

14 Woomyundong, Sochogu, Seoul, 137-140, Korea

Phone : 02-577-5766 Fax : 573-1914 E-mail : gbai@hotmail.com

서 론

결핵은 아직도 우리나라에서 심각한 보건문제 중의 하나이다. 우리나라의 결핵 발생율은 인구 10만 명당 70명이며 이중 도말양성자는, 인구 10만명당 31명 수준이다¹. 더욱이 우리나라 폐결핵 환자 중에서 한가지 이상 항결핵약제 내성률은 10.6%에 이른다². 결핵신환자 중에서 아이나 내성률은 8.6%, 리팜피신 내성률은 3.0%이었으며, 다제내성률은 2.2%이었다². 아이나와 리팜피신은 결핵치료에 가장 효과적인 항결핵약제이므로, 이 두 약제의 내성을 포함하는 다제내성균(multi drug resistance, MDR)은 환자의 치료효율을 떨어뜨릴 뿐만 아니라³ 지속적인 다제내성균 전파원(transmission source)으로 작용하여 국가결핵관리의 부담을 가중시키게 된다. 아이나와 리팜피신 내성균의 조기검출을 통해 적절한 항결핵약제를 신속히 투여함은 다제내성환자의 관리에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다⁴.

본 연구에서는 우리나라 결핵 환자들의 아이나와 리팜피신 내성에 관련되어 있는 유전자의 분포를 분석하고 이 중 아이나와 리팜피신 내성에 가장 관련성이 높은 유전자를 선택하여 해당 유전자의 돌연변이를 역교잡반응법(Reverse hybridization technique)을 이용하여 내성균 검출을 시도하였고, 이 방법이 직접 임상검체에 적용할 수 있는지를 평가하였다.

대상 및 방법

1. 균주수집 및 감수성검사

본 연구에 사용된 502 내성균주는 1998년부터 결핵연구원에 약제 감수검사가 의뢰된 균주 중에서 검사 결과 아이나 또는 리팜피신에 내성인 균을 선택하였다. 502주는 아이나와 리팜피신에 동시 내성인 다제내성균을 231주, 아이나 단독내성균이

167주, 리팜피신을 제외한 아이나와 다른 약제 동시내성을 가진 균주가 71주, 리팜피신 단독내성균이 26주, 아이나를 제외한 리팜피신과 여타 다른 약제에 동시 내성인균 7주 등으로 이루어졌다.

약제 감수성 검사는 Löwenstein Jensen (LJ) 배지를 이용한 내성비율법에 따라서 실시하였다⁵. 약제함유 농도는, 아이나 0.2 mcg/ml, 리팜피신 40 mcg/ml, 스트렙토마이신 10 mcg/ml, 에탐부톨 2 mcg/ml, 가나마이신 40 mcg/ml, 엔비오마이신 40 mcg/ml, 프로치오나마이드 40 mcg/ml, 사이클로세린 30 mcg/ml, 파스 1 mcg/ml, 오플로락신 2 mcg/ml로 하였다. 피라지나마이드는 pyrazinamide test로 감수성검사를 실시하였다⁵.

2. 중합효소연쇄반응 역교잡반응법

rpoB, *katG*, *inhA*, *ahpC* 유전자의 증폭을 위한 primer 및 돌연변이를 검출하기 위한 probe는 Table 1에 나타내었다. 돌연변이 검출을 위한 probe는 *rpoB* 유전자의 핵심부위 81 bp (codons 507-533), *katG* 유전자의 codon 315, *inhA* 유전자와 *ahpC* 유전자의 promoter 부위에서 정상적인 염기서열과 돌연변이 염기서열을 바탕으로 합성하였다.

중합효소연쇄반응의 annealing 온도는 65°C 이었고, 중합효소연쇄반응 용량은 100 µl이었고, 성분은 10x *Taq* polymerase buffer 10 ul, 2mM MgCl₂, 각 primer 20 pM, 2 mM의 4가지 dNTP, 1 U의 *Taq* polymerase (AP Biotech, Uppsala, Sweden) 그리고 50~200ng의 DNA가 포함되었다. 중합효소연쇄반응은 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 실

Table 1. Primers and probes for detection of mutation in *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* genes

Primers or probes	oligonucleotides	remark
<i>rpoB</i> forward primer	5' tggctccgcttgacagagggtcaga 3'	
<i>rpoB</i> reverse primer	5' ccctcaggggtttcgatcgg 3'	biotin labeling at 5' end
<i>katG</i> forward primer	5' tggggctgatctacgtgaacc 3'	
<i>katG</i> reverse primer	5' cccactcgtagccgtacagg 3'	biotin labeling at 5' end
<i>inhA</i> forward primer	5' cgacatacctgctgcgcaat 3'	
<i>inhA</i> reverse primer	5' cgggatacgaatgggggttt 3'	biotin labeling at 5' end
<i>AhpC</i> forward primer	5' gagaccggcttccgaccacc 3'	
<i>AhpC</i> reverse primer	5' gctggtaggcggggaatgat 3'	biotin labeling at 5' end
Probes from <i>rpoB</i> , RW1	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' agccagctgagcctattcat 3'	Point mutation from Gln to Leu at codon 513
RW2	5' ttcattgaccagaacaaccg 3'	wild sequences from codon 514 to 520
RM21	5' ttcattgaccagaacaaccg 3'	Point mutation from Asp to Val at codon 516
RM22	5' ttcattgaccagaacaaccg 3'	Point mutation from Asp to Tyr at codon 516
RW3	5' ccgctgctggggttgacc 3'	wild sequences from codon 520 to 525
RM3	5' ccgctgctggggttgacc 3'	Point mutation from Ser to Leu at codon 522
RW4	5' ttgaccacaaagcgccga 3'	wild sequences from codon 524 to 530
RM41	5' ttgaccacaaagcgccgact 3'	Point mutation from His to Tyr at codon 526
RM42	5' ttgaccacaaagcgccgact 3'	Point mutation from His to Asp at codon 526
RW5	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' tcggcgccggggcccgcc 3'	Point mutation from Leu to Pro at codon 533
Probes from <i>katG</i> , KW	5' tcaccagcgcatcgaggt 3'	wild sequences from codon 313 to 319
KM	5' tcaccagcgcatcgaggt 3'	Point mutation from Ser to Thr at codon 315
Probes from <i>inhA</i> , MW	5' cggcgagacgataggttgctcg 3'	wild sequences from 23 to 2 promoter region
MM	5' cggcgagatgataggttgctcg 3'	Point mutation from c to t at position 15
Probes from <i>ahpC</i> , AW	5' ttcacggcacgatggaatgt 3'	wild sequences from 19 to +1 promoter region
AM1	5' ttcacggcacgatggaatgt 3'	Point mutation from g to a at position 6
AM2	5' caggcaagatggaatgtc 3'	Point mutation from c to a at position 10

시하였다.

여러 유전자 돌연변이 검출을 위한 역교잡반응은 Kox 등의 방법을 적용하였다⁶. 간단히 서술하면, probe들은 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 중합효소연쇄반응 산물은 streptavidin-alkaline phosphatase를 처리한 다음 NBT/BCIP 기질로 발색시켰다.

결 과

1. 리팜피신 내성균 264주의 *rpoB* 유전자 돌연변이 분석

중합효소 연쇄반응 산물은 예상대로 439bp로 나타났다. 리팜피신 내성균주 264주 중에서 14개의 *rpoB* probe를 사용한 역교잡법에 의해서 총 244개의 돌연변이 균주(92.4%)를 검출할 수 있었다. 돌연변이 분포를 보면 가장 많은 돌연변이는 Ser531Leu로서 121균주(45.8%)이었다. Codon 526에서는 84주(31.8%),

Table 2. Distribution of *rpoB* gene mutations among RMP resistant strains (RMP^R).

Mutation type of <i>rpoB</i> gene	Region of probes	MDR* RMP ^R (n=231)	non MDR RMP ^R (n=33)	p value	Total (n=264)
Leu511Pro	ΔRW1/RM11	4	0	0.4473	4(1.5%)
Gln513Leu	ΔRW1/RM12	3	0	0.5109	3(1.1%)
Asp516Val	ΔRW2/RM21	20	2	0.6139	22(8.3%)
Asp516Tyr	ΔRW2/RM22	5	0	0.3949	5(1.9%)
Ser522Leu	ΔRW3/RM3	3	0	0.5109	3(1.1%)
His526Tyr	ΔRW4/RM41	30	5	0.7327	35(13.3%)
His526Asp	ΔRW4/RM42	9	2	0.5622	11(4.2%)
Others at W4 probe	ΔRW4	36	2	0.1457	38(14.4%)
Ser531Leu	ΔRW5/RM51	105	16	0.7443	121(45.8%)
Leu533Pro	ΔRW5/RM52	1	1	0.1072	2(0.8%)
None		15	5	0.0792	20(7.6%)

*MDR: multi drug resistance, *M. tuberculosis* strains with simultaneous resistance at least in INH and RMP.

Table 3. Distribution of INH resistance mutations among INH resistant strains(INH^R)

Mutated gene	MDR INH ^R (n=231)	non MDR INH ^R (n=238)	p-value	Total (n=469)
<i>katG</i>	135 (58.4%)	155 (65.1%)	0.1337	290(61.8%)
<i>katG</i> & <i>inhA</i>	7 (3.0%)	1 (0.4%)	0.0304	8(1.7%)
<i>inhA</i> gene	31 (13.4%)	46 (19.3%)	0.0830	77(16.4%)
<i>inhA</i> & <i>ahpC</i>	1 (0.4%)	2 (0.8%)	0.5454	3(0.6%)
<i>ahpC</i>	7 (3.0%)	4 (1.7%)	0.3435	11(2.3%)
None	50 (21.6%)	30 (12.6%)	0.0096	80(17.1%)

katG: point mutation from Ser to Thr at codon 315; *inhA*: point mutation from c to t at position -15 of promoter region; *ahpC*: point mutation from g to a at position -6 or from c to a at position -10 of promoter region; *katG* & *inhA*: simultaneous mutation at *katG* and *inhA*; *inhA* & *ahpC*: simultaneous mutation at *inhA* and *ahpC*

codon 516에서는 27주(10.2%)가 검출되었다(Table 2). 다제내성균주 231균주와 그외 리팜피신 내성균 33주의 돌연변이 분포는 다음과 같았다. 다제내성균 231주 중에서, Ser531Leu 돌연변이가 105주(45.5%)이었고, 75주(32.5%)는 526 codon에서 나타났다. Asp516Val 돌연변이는 25주이었고, Leu511Pro는 4주, Gln513Leu는 3주, Ser522Leu는 3주, Leu533Pro는 1주이었다. 15주(6.5%)는 아무런 돌연변이가 없었다. 다제내성균이 아닌 리팜피신내

성균 33주의 돌연변이 분포에서는, 역시 Ser531Leu 돌연변이가 16주(48.4%)로 가장 많았었고, 두번째로 많은 돌연변이는 526 codon에서 9주(27.2%)이었다. Asp516Val 돌연변이는 2주(6.1%)이었고, Leu533Pro는 1주(3.0%)이었으며 5주(15.2%)는 감수성검사에서는 내성이었음에도 81bp내 돌연변이는 없었다(Table 2). 다제내성균과 비다제내성균간의 돌연변이 분포에서 통계적 유의성은 없었다.

2. 아이나 내성균 469주의 *katG*, *inhA*, *ahpC* 유전자 돌연변이 분석

katG, *inhA*, *ahpC* 유전자에 대한 중합효소연쇄반응의 산물은 예상대로 각각 351bp, 264bp, 292bp로 나타났다. 아이나 내성균을 역교잡법으로 검출하기 위해서 *katG* probe 2개, *inhA* probe 2개, *ahpC* probe 3개를 사용하여 아이나 내성균의 82.9%를 성공적으로 검출할 수 있었다.

아이나 내성균 469주 중에서, *katG* 돌연변이는 298주(63.5%)이었고, *inhA* 돌연변이는 88주(18.8%)이었으며 *ahpC* 돌연변이는 14주(2.9%)이었다. 이 중에는 중복 돌연변이를 나타내는 군주가 11주가 포함되어 있다(Table 3).

이를 다제내성균과 다제내성이 아닌 아이나 내성균주로 나누어 보면, 다제내성균 231주의 분포에서는, *katG* 돌연변이는 142주(61.5%)이었고, *inhA* 돌연변이는 39주(16.9%)이었으며 *ahpC* 돌연변이는 8주(3.5%)이었다. 이 중에는 중복 돌연변이를 나타내는 군주가 8주가 포함되어 있다. 감수성검사에서는 내성균이었음에도 이 세가지 유전자의 돌연변이를 검출할 수 없었던 군주는 50주(21.6%)이었다. 다제내성이 아닌 아이나 내성균 238주 중에서는 *katG* 돌연변이는 156주(65.5%)이었고, *inhA* 돌연변이는 49주(20.5%)이었으며 *ahpC* 돌연변이는 6주(2.5%)이었다. 이 중에는 중복 돌연변이를 나타내는 군주가 3주가 포함되어 있다. 그리고 이 세가지 유전자에서 검출할 수 없었던 군주는 30주(12.6%)로(Table 3), 역교잡반응법으로 검출할 수 없는 군이 다제내성균(21.6%)보다 유의하게 낮았다($p < 0.01$).

고 찰

리팜피신의 내성의 90%이상은 DNA dependent RNA polymerase의 β -subunit을 만드는 유전자

rpoB 내의 돌연변이에 의해 발생된다⁷⁻¹¹. 이 유전자 내 돌연변이를 검출하는 것은 곧 리팜피신 내성균을 확인하는 것이 된다. *rpoB* 내의 돌연변이를 찾기 위한 방법으로 line probe assay kit (LiPA, Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium)가 상품으로 개발되어 국내에서도 사용되어 왔다¹².

본 연구에서는 Ser531Leu 돌연변이가 46%이었고, His526Tyr 돌연변이가 13%이었고, His526Asp 돌연변이가 4%이었으며, 그 외 526 codon 돌연변이가 14%이었는데, 이 결과는 우리나라에서 분리된 균주로 실험하였던 박 등, 김 등의 결과와 비슷하였다.¹²⁻¹³ 박 등의 결과에서는 Ser531Leu 돌연변이가 47%이었고, His526Tyr 돌연변이가 12%이었고, His526Asp 돌연변이가 7%이었으며,¹² 김 등의 결과에서는 Ser531Leu 돌연변이가 24.4%이었고, His526Tyr 돌연변이가 19%이었고, His526Asp 돌연변이가 3%이었으며, 그 외 526 codon 돌연변이가 16%이었다¹³.

본 연구의 codon 531 돌연변이 비율은 46%로서 중국에서 분리된 균을 이용한 Yue 등의 결과(41%)와 비슷하였고, codon 516 (10% 대 5%)과 codon 526 (32% 대 40%)에서도 유의한 차이를 보이지 않았다¹⁴. Mexico에서는 분리된 균주를 사용한 실험 결과는 Ser531Leu 돌연변이는 54%, codon 526 돌연변이는 30%이었고¹⁵, codon 531 돌연변이가 *rpoB* 내에서 가장 많은 것은 일반적인 현상이다.

아이나 내성균은 catalase peroxidase의 활성화 관계가 있다는 발견은 오래 되었으나¹⁶, Zhang 등이 이 효소를 만드는 유전자 *katG*를 발견함으로써 아이나 내성 관련 연구가 활발하게 되었다¹⁷. 아이나 내성균의 약 50%는 *katG* 유전자의 돌연변이에 의해서 발생한다는 보고가 발표 되었다¹⁸⁻²². 본 연구에서도 아이나 내성균의 62%가 *katG* 유전자 Ser315Thr 돌연변이를 나타내어 다른 보고들과 비슷하였다.

아이나 감수성 결핵균은 mycolic acid 합성이 억

제된다는 사실을 알게 되었다²³. *M. smegmatis*로부터 mycolic acid 합성에 관련된 효소를 찾게 되었으며²⁴ 그 결과 이 효소는 InhA, 즉 enoyl acyl carrier protein (ACP) reductase이고 그 유전자는 *inhA*이며, 이 유전자의 promoter 돌연변이는 이 효소를 과량 생산하여 아이나에 의한 mycolic acid 합성 억제 효과를 떨어뜨려 내성을 나타낸다고 보고되고 있다²⁵. 비록 Type II Fatty Acid Synthetase(FAS) system의 InhA, KasA(ketoacyl ACP synthase), AcpM(acyl carrier protein specific for long chain fatty acids)의 돌연변이가 아이나 내성을 줄 가능성은 있지만²⁶, 이들 중에서 현재까지는 *inhA* 유전자 돌연변이만 아이나 내성과 관련이 있는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 *inhA* 돌연변이 비율이 18.7%로서 South Africa에서 분리된 균으로 실험한 Kiepiela의 결과(24%)²⁷ 보다 다소 낮았다.

또 다른 아이나 내성관련 유전자는 alkylhydroperoxidase(AhpC)를 만드는 *ahpC*이다. AhpC 돌연변이의 내성 기작은 완전히 밝혀져 있지는 않았지만 promoter의 돌연변이는 이 효소의 과잉생산을 유도하고, 이는 손상된 KatG 활성을 보완해 줄 것으로 생각되고 있다²⁸. 본 연구에서는 아이나 내성균 중에서 *ahpC* 돌연변이는 3%에 불과하였으며 Kiepiela의 결과(13%)²⁷ 보다 낮았다. 그리고 Kiepiela의 결과에서 나타난 *katG*와 *ahpC* 동시 돌연변이는 본 연구에서는 발견되지 않았다. 모든 *ahpC* 돌연변이 균주는 KatG 활성을 가지고 있어서 적어도 *ahpC* 돌연변이 균주와 KatG 활성과 직접적인 관계는 없는 것으로 보인다. 본 연구에서 역교잡법으로 발견할 수 없었으나 Ramaswamy의 결과에서 나타난 *fuaA*, *iniC*, *Rv1592c* 등의 돌연변이에 의한 아이나 내성균도 존재할 수 있다²⁹.

본 연구에서 사용한 유전자 검출방법만으로도 리팜피신 내성균의 92%이상, 아이나 내성균의 83%

를 검출할 수 있으므로 이 방법은 다제내성균의 조기 검출에 매우 유용한 것으로 판단 되었다.

요 약

연구배경 :

다제내성균의 신속한 확인을 가능케 해주는 감수성검사법은 신속한 처방결정을 통해 환자의 치료 성공률을 향상 시킴과 동시에 다제내성균의 전파를 조기에 차단할 수 있게 되어, 국가 결핵관리 사업의 효율성을 증대시킬 수 있다.

방 법 :

아이나 또는 리팜피신 내성에 관련된 유전자 *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* 등의 돌연변이를 검출할 수 있는 probe를 합성하였고, 총 502개의 내성균을 대상으로 중합효소연쇄반응 역교잡반응법으로 내성균 검출을 시도하였다.

결 과 :

264개의 리팜피신 내성균 중에서 Ser531Leu돌연변이가 46%를 차지하였고, codon 526에서는 32%의 균주에서 돌연변이를 보였으며, codon 516에서는 10%의 균주가 돌연변이를 나타냈다. 469개의 아이나 내성균 중에서는 64%가 *katG* 유전자의 Ser315Thr 돌연변이를 나타내었고, 19%의 균은 *inhA* 유전자 promoter 돌연변이를 가지고 있었으며, *ahpC* 유전자 돌연변이는 3%에 불과하였다. 역교잡반응법에 의한 검출율은 아이나 내성균 중 80%이상이었으며, 리팜피신 내성균에서도 92%이상을 검출할 수 있었다.

결 론 :

역교잡반응법에 의해 리팜피신 뿐만 아니라 아이나에 대한 감수성검사를 신속하게 수행할 수 있음을 확인하였고, 이 검사법은 특히 재발 또는 다제내성이 의심되는 환자의 처방 결정에 매우 유용한 수단이 될 수 있다.

참 고 문 헌

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2003. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB2003.316
2. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, Hoffner S, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med* 2001;344:1294-303.
3. Telzak EE, Sepkowitz K, Alpert P, Manheimer S, Merdard F, el-Sadr W, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in patients without HIV infection. *N Engl J Med* 1995;333(14):907-11.
4. Drobniewski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* - a molecular story. *J Med Microbiol* 1998;47(3):189-96.
5. Kim SJ, Bai GH, Hong YP. Drug resistant tuberculosis in Korea, 1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1(4):302-8.
6. Kox LEF, 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.
7. Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, et al. Implications of multidrug resistance for the future of short course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* 1994; 344:293-8.
8. Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, et al. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 1994;32:1095-8.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
10. Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, et al. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2380-6.
11. Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PR, et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1853-7.
12. Park YK, Kim BJ, Ryu S, Kook YH, Choe YK, Bai GH, Kim SJ. Cross-resistance between rifampicin and KRM-1648 is associated with specific *rpoB* alleles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:166-70.
13. Kim BJ, Kim SY, Park BH, Lyu MA, Park IK, Bai GH, Kim SJ, Cha CY, et al. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1997;35:492-4.
14. Yue J, Shi W, Xie J, Li Y, Zeng E, Wang

- H. Mutations in the *rpoB* gene of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2209-12.
15. Viader Salvado JM, Luna Aguirre CM, Reyes-Ruiz JM, Valdez-Leal R, et al. Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. *Microb Drug Resist* 2003;9:33-8.
16. Middlebrook G, Cohn ML. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science* 1953;118: 297-9.
17. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992;358:591-3.
18. Stoeckle MY, Guan L, Riegler N, Weitzman I, Kreiswirth B, et al. Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J Infect Dis* 1993;168:1063-5.
19. Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, et al. Characterization of the catalase peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis* 1996;173:196-202.
20. Rouse DA, Li Z, Bai GH, Morris SL. Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2472-7.
21. Saint-Joanis B, Souchon H, Wilming M, Johnsson K, Alzari PM, Cole ST. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 1999;338: 753-60.
22. Wengenack NL, Uhl JR, St. Amand AL, Tomlinson AJ, Bensen LM, et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG (S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. *J Infect Dis* 1997;176:722-7.
23. Quemard A, Lacave C, Laneelle G. Isoniazid inhibition of mycolic acid synthesis by cell extracts of sensitive and resistant strains of *Mycobacterium aurum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1035-9.
24. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994;263:227-30.
25. Quemard A, Sacchettini JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittman R, Jacobs WR Jr, et al. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 1995;34:8235-41.
26. Slayden RA, Barry CE 3rd. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 2000; 2:659-69.
27. Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L,

- York DF. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *ahpC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis* 2000; 80:47-56.
28. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, et al. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1996;272:1641-3.
29. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1241-50.
-