

다제내성 결핵 균주에서 리팜핀과 리파부틴간의 교차내성률 및 *rpoB* 유전자 돌연변이와의 연관성

국립마산병원¹, 국제결핵연구센터²

김병주^{1,2}, 오승환^{1,2}, 조은진², 박승규^{1,2}

Cross-resistance Between Rifampicin and Rifabutin and Its Relationship with *rpoB* Gene Mutations in Clinically Isolated MDR-TB Strains

Byoung Ju Kim M.D.^{1,2}, Seung Hwan Oh^{1,2}, Eun Jin Cho², Seung Kyu Park M.D.^{1,2}

¹National Masan Hospital, Masan, Korea ²International Tuberculosis Research Center, Masan, Korea

Background : Despite the emerging danger of MDR-TB to human beings, there have only been a limited number of drugs developed to treat MDR-TB since 1970. This study investigated the cross-resistance rate between rifampicin (RFP) and rifabutin (RBU) in order to determine the efficacy of rifabutin in treating MDR-TB. In addition, the results of rifabutin were correlated with the *rpoB* mutations, which are believed to be markers for MDR-TB and RFP resistance.

Methods : The MICs of RBU were tested against 126 clinical isolates of MDR-TB submitted to the clinical laboratory of National Masan TB Hospital in 2004. Five different concentrations (10-160µg/ml) were used for the MICs. The detection of the *rpoB* mutations was performed using a RFP resistance detection kit with a line probe assay(LiPA), which contains the oligonucleotide probes for 5 wide type and 3 specific mutations (513CCA, 516GTC, and 531TTG). The *rpoB* mutation was determined by direct sequencing.

Results : The rate of cross-resistance between RFP and RBU was 70.5%(74/105) at 20µg/ml RBU(ed note: How much RFP?) Most mutations (86.3%) occurred in the 524~534 codons. The His526Gln, His526Leu, Leu533Pro, Gln513Glu, and Leu511Pro mutations(Ed note: Is this correct?) were associated with the susceptibility to RBU.

Conclusion : Based on the cross-resistance rate between RFP and RBU, RBU may be used effectively in some MDR-TB patients. Therefore, a conventional drug susceptibility test for RBU and a determination of the critical concentration are needed. However, *rpoB* gene mutation test may be have limited clinical applications in detecting RBU resistance. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 171-179)

Key words : MDR-TB, cross-resistance, rifabutin, rifampin, *rpoB* mutation

서 론

Rifabutin (RBU)은 rifamycin S의 반합성 유도체인 spiro-piperidyl rifamycin이다. 생체내 및 실험실 검사상에서 *Mycobacterium tuberculosis* 및 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex와 같은 지연 성장 마이코박테리아에 대하여 rifampin (RFP)보다 더 효과가 좋으며 일부 RFP 내성 결핵에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다¹⁻⁴. 지금까지 보고된 RFP과

RBU과의 교차 내성률은 보고에 따라 53.5%에서 90%로 다양하다⁵⁻¹⁰. 국내 보고에 의하면 심 등⁹은 52개의 다제내성 균주를 대상으로 한 실험에서 90%의 교차 내성률을 보고하였고, 208개의 다제내성 균주를 대상으로 한 류 등¹⁰은 79.6%의 교차 내성률을 보고한 바 있다. 이러한 두 약제간의 교차 내성은 결핵균의 RNA polymerase의 beta-subunit을 코딩하고 있는 *rpoB* 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 밝혀졌다¹¹⁻¹³. 즉, RFP은 결핵균의 RNA polymerase에 작용하여 결핵균의 RNA합성을 차단함으로써 항결핵 작용을 나타내는데 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 RBU 내성에도 관여하기 때문이다. 현재 RFP 내성 균주의 96-98%에서 *rpoB* 유전자 돌연변이가 확인되는데 대부분이 81개의 염기서열 부위에 집중적으로 발생하며 531, 516, 526번째 코돈의 돌연변이가 가장 흔하게 발견된

Address for correspondence : **Byoung Ju Kim, M.D.**
Clinical Research Center, National Masan TB Hospital
Kapo-dong, 486, Masan, Kyengsangnamdo, 631-710, Korea
Phone : 82-55-249-3785 Fax : 82-55-249-0992
E-mail : byoungju_kim@yahoo.com
Received : Jan. 4. 2006
Accepted : Feb. 3. 2006

다¹⁴. 이를 근거로 *rpoB* 유전자 돌연변이를 확인하여 RFP 내성을 신속하게 검사할 수 있는 INNO-LiPA Rif. TB (Innogenetics, Belgium) 검사와 같은 신속검사법이 임상에서 많이 사용되고 있다^{15,16}.

RBU 내성과 *rpoB* 유전자 돌연변이와의 연관성에 관한 기존의 연구에 따르면 *rpoB* 유전자 531번째 코돈의 돌연변이는 RPF과 RBU 모두에 그리고 516 코돈의 변이는 RPF에만 내성을 유발하며 526번째 코돈의 변이는 치환된 아미노산의 종류에 따라 내성양상이 달라짐을 밝히고 있다¹¹. 하지만 또 다른 연구¹³에서는 526번째 코돈의 변이는 주로 RBU에 대한 감성과 연관이 있다고 하여 아직까지 RBU 내성과 *rpoB* 유전자 돌연변이와의 관계가 명확하지 않다.

이에 본 연구에서는 다제내성 결핵 균주들을 대상으로 RFP과 RBU과의 교차 내성률을 알아보고 또한 이러한 내성 양상과 *rpoB* 유전자 돌연변이 종류와의 연관성을 조사함으로써 다제내성 결핵의 치료에 있어서 RBU의 효용성 및 *rpoB* 유전자 돌연변이 검사를 이용한 RBU 감수성 신속검사의 임상적 사용 가능성에 대하여 연구하고자 한다.

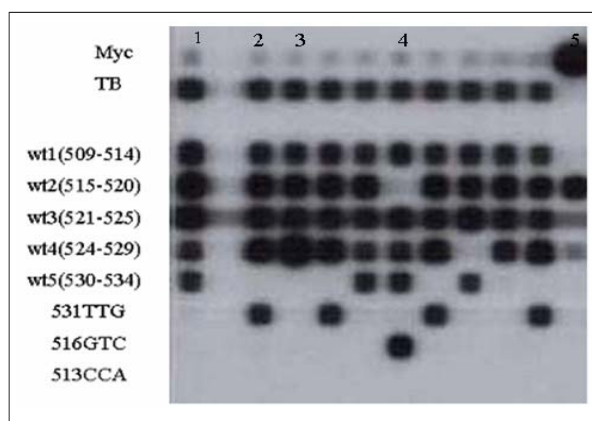


Figure 1. The representative figure of results of REBA MTB-Rifa[®]

No.1 shows no *rpoB* mutation. All of 5 sensitive bands are there.

No.2 shows TCG(Ser)531TTG(Leu) mutation. There is 531TTG band instead of wt5 band.

No.3 indicates the isolate has a *rpoB* mutation other than TCG(Ser)531TTG(Leu) on wt5(530-532) because of missing 531TTG band.

No.4 is GAC(Asp)516GTC(Val) mutation.

No.5 shows the isolate is not *M. tuberculosis* because of missing TB band.

방 법

1. 임상 결핵 균주

2004년 1년간 국립마산결핵병원 미생물 검사실에 의뢰되어서 시행된 약제감 수성 검사상 적어도 RFP과 isoniazid에 동시내성으로 확인되어 냉동 보관 중인 130개의 다제내성 균주를 대상으로 하였다.

2. 약제감수성 검사 및 최소억제농도의 결정

약제감수성 검사는 Canetti 등¹⁷이 소개한 Lowenstein-Jensen (L-J) 배지를 이용한 절대농도법으로 시행하였다. RFP은 40μg/ml의 단일 농도를 이용하여 내성유무를 판정하였고 RBU은 최고농도 160μg/ml를 10μg/ml까지 2배수로 4번 계대 희석하여 얻은 10, 20, 40, 80, 160μg/ml의 5가지 농도를 이용하여 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, 이하 M-IC)를 측정하였다. RBU의 내성기준 농도는 RFP의 1/2인 20μg/ml로 하여 RBU의 MIC가 20μg/ml이상일 때 내성으로 판정하였다. 상기 실험은 두 번 반복하였으며 서로 상이한 결과는 분석에서 제외되었다.

3. *rpoB* 유전자 돌연변이의 검출

RFP 신속 내성검사에 사용되는 REBA MTB-Rifa[®] (M&D, Korea)를 사용하였다. 이 검사는 *rpoB* 유전자의 돌연변이 유무를 확인할 수 있는 다섯 개의 wild-type oligonucleotide (wt1: 코돈 509-514, wt2: 515-520, wt3: 521-525, wt4: 524-529, wt5: 530-534)와 특이 돌연변이를 확인할 수 있는 다섯 개의 oligonucleotide (513CCA, 516GTC, 531TTG, 526AAC, 511CCG)가 부착된 니트로셀룰로즈 막으로 구성되어 있다(본 연구에서는 돌연변이 빈도가 작은 것으로 알려진 526AAC, 511CCG를 제외하고 실험하였다). 결핵균의 *rpoB* 유전자 부위를 중합효소연쇄반응을 이용하여 증폭한 후 막에 역교잡(reverse blot hybridization)시킨다. 그 후 발색반응에서 나타난 밴드를 이용하여 각 oligonucleotide의 hybridization 유무를

Table 1. The number of MDR-TB isolates showing an initial inhibition at the following concentration of rifabutin.

		2nd result						Total
	$\mu\text{g/ml}$	10	20	40	80	160	>160	
1st result	10	27	4					31
	20							0
	40			3	2	4		9
	80			4	4	18	1	27
	160			2	2	13	2	19
	>160			3		13	3	19
Total		27	4	12	8	48	6	105

확인한다. 판독은 5개의 wild-type oligonucleotide에 해당하는 밴드가 나타나지 않으면 그 영역에서 돌연변이가 있는 것으로 보고 내성으로 판독하며 특이 돌연변이의 oligonucleotide에 해당하는 밴드가 나타나면 결핵균은 특이 돌연변이를 갖는 내성균으로 판독한다(Fig. 1).

상기검사는 3개의 특이 돌연변이를 제외하면 단지 결핵균의 *rpoB* 돌연변이 유무만을 알 수밖에 없는 한계가 있기 때문에 *rpoB* 유전자의 직접염기서열결정법(direct sequencing)을 시행하여 그 결과와 비교하였다. 비교된 결과를 이용하여 RFP의 신속내성 검사에 사용되는 REBA MTB-Rifa[®]가 RBU의 신속내성 검사 진단에도 유용할지를 알아보았다.

결 과

실험에 사용된 총 130개의 균주 중 6 균주는 비결핵 항산균으로 판명되었고, 1 균주는 오염으로 판독이 불가능하였으며, 18 균주는 RBU에 대한 약제감수성 결과가 첫 번째와 두 번째 실험에서 서로 상이하여 결과분석에서 제외되어 총 105 균주가 결과분석에 포함되었다.

1. RFP과 RBU 사이의 교차내성 빈도

1차 실험에서 RBU의 각 농도에서 최초로 성장이 억제되는 균수는 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 31균주, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0균주, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 9균주, 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서 27균주, 160

$\mu\text{g/ml}$ 에서 19균주였고, 19균주는 160 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 성장이 억제되지 않았다. 따라서 총 균주의 50%의 성장을 억제할 수 있는 MIC₅₀은 80 $\mu\text{g/ml}$, 총 균주의 90%의 성장을 억제할 수 있는 MIC₉₀은 160 $\mu\text{g/ml}$ 이상으로 나타났다(Table 1). 2차 실험 결과는 1차 실험 결과와 유사하여 MIC₅₀은 80 $\mu\text{g/ml}$ 로 같았으나 MIC₉₀은 160 $\mu\text{g/ml}$ 로 2차 실험에서 보다 낮았다(Table 1). R-BU의 내성기준농도를 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 하였을 때 RFP과 RBU간의 교차내성률은 70.5%(74/105)였다.

2. REBA MTB-Rifa[®]를 이용한 *rpoB* 유전자 돌연변이의 검출

RFP과 RBU간의 교차내성률 분석에 사용된 105 균주 중 판독이 불가능한 5 균주를 제외한 100 균주에서 REBA MTB-Rifa[®]검사로 *rpoB* 유전자의 돌연변이 유무를 확인할 수 있었다.

두 균주에서 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 없었으며, 세 균주에서는 각 균주 당 2개의 돌연변이가 있었고, 95 균주에서는 각 균주 당 하나의 돌연변이가 있었다. 따라서 전통적인 약제감수성 검사 결과와 비교하였을 때 REBA MTB-Rifa[®]를 이용한 RFP 내성의 진단율(일치율)은 98%(98/100)였다.

균주 당 하나의 돌연변이를 보인 95개의 균주에서 돌연변이 부위를 분석하였을 때 가장 흔한 구역은 wt5 구역(530-534번째 코돈)으로 60.0%(57/95)를 차지하였으며 다음으로 wt4 구역(524-529 코돈, 26.3%), wt2 구역(515-520 코돈, 7.4%), wt1 구역(509-514 코돈, 6.3%) 순이었으며, wt3 구역(521-525 코돈)에서

Table 2. The number of MDR-TB isolates showing mutation at 5 different region or 3 specific mutations. The number is divided by resistance or susceptibility to rifabutin.

	No.	DST	
		R	S
wt1 (509~514)	4	3	1
513CCA	2	2	0
wt2 (515~520)	5	1	4
516GTC	2	1	1
wt3 (521~525)	0	0	0
wt4 (524~529)	25	19	6
wt5 (530~534)	18	6	12
531TTG	39	35	4
Total	95	67	28

는 돌연변이가 발견되지 않았다(Table 2). rpoB 유전자의 돌연변이는 wt5 및 wt4 즉, 524번째 코돈에서 534 코돈사이에 집중적(86.3%)으로 일어남을 알 수 있었다.

돌연변이의 위치와 RBU의 내성 여부와의 관련성을 알아보기 위해 공통구역에 돌연변이가 있는 균주들 및 특이 돌연변이가 있는 균주들을 억제감수성 검사 결과에 따라 내성 및 감수성으로 분류하였다(Table 2). 같은 구역안의 돌연변이도 균주에 따라 내성

Table 3. Detection of rifabutin-susceptible isolates by LiPA (reverse blot hybridization method) compared to conventional method (drug susceptibility test).

		Conventional Method (DST)		Total
		S	R	
REBA	S	17	8	25
MTB-Rifa	R	11	59	70
Total		28	67	95

While any mutation in wt2, wt5, Gln513CCA(Pro), and Asp516GTC(Val) were regarded as RBU susceptibility, any mutation in wt1, wt4, and Ser531TTG(Leu) were regarded as RBU resistance according to the majority of the DST results for each mutation of 5 wide type (wt1~wt5) and 3 specific mutation(513CCA, 516GTC, and 531TTG).

및 감수성의 다른 결과를 보였으나 빈도가 많은 쪽에 따라 각 구역을 내성 혹은 감수성으로 이분하였다. 즉, wt1, wt4, Ser531TTG(Leu)의 돌연변이가 있을 때 모두 RBU에 내성으로, 그리고 wt2, wt5, Gln513-CCA(Pro), Asp516GTC(Val)의 돌연변이는 모두 감수성으로 정의하고 이를 억제감수성 검사 결과와 비교하였을 때 RBU 감수성균을 감수성이라고 할 확률, 즉 민감도는 60.7%(17/28), 내성균을 내성균이라고 할 확률, 즉 특이도는 88.1%(59/67)로 나타났다(Tab-

Table 4. Profile of rpoB mutations in 94 MDR-TB isolates and its relationship with rifabutin susceptibility by conventional drug susceptibility test

Codon	Wild-type	mutations	DST		Total
			R	S	
531	TCG(Ser)	TTG(Leu)	36	5	45(45.5%)
		TGG(Trp)	2	0	
		TTC(Phe)	2	0	
		TAC(Tyr)	10	2	
		CGC(Arg)	3	1	
526	CAC(His)	GGC(Gly)	2	0	24(24.3%)
		GAC(Asp)	2	0	
		CCC(Pro)	1	0	
		CAA(Gln)	0	1	
		CTC(Leu)	0	2	
533	CTG(Leu)	CCG(Pro)	2	11	13(13.2%)
516	GAC(Asp)	TAC(Tyr)	1	2	7(7.0%)
		GTC(Val)	1	1	
		GGC(Gly)	1	1	
513	CAA(Gln)	CCA(Pro)	2	0	6(6.0%)
		AAA(Lys)	2	0	
		CTA(His)	1	0	
		GAA(Glu)	0	1	
530	CTG(Leu)	ATG(Met)	3	0	3(3.0%)
511	CTG(Leu)	CCG(Pro)	0	1	1(1.0%)
Total			71	28	99(100%)

Table 5. Detection of rifabutin-susceptible isolates using direct sequencing of *rpoB* mutations

	Conventional Method (DST)			Total
		S	R	
<i>rpoB</i> mutations	S	20	5	25
	R	8	66	74
	Total	28	71	99

According to the majority of the DST results for each mutation, His526Gln, His526Leu, Leu533Pro, Gln513Glu, and Leu511Pro were regarded as RBU susceptibility, and Ser531Leu, Ser531Trp, Ser531Phe, His526Tyr, His526Arg, His526Gly, His526Asp, His526Pro, Gln513Pro, Gln513Lys, Gln513His, and Leu530Met as RBU resistance respectively. Asp516Tyr, Asp516Val, and Asp516Gly were regarded as RBU susceptibility based on the previous reports^{10,11}

le 3). 따라서 REBA MTB-Rifa[®]검사를 이용하여 RBU 내성 유무를 확인하는 데 제한이 있음을 알 수 있었다.

3. 직접염기서열결정법에 의한 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출

REBA MTB-Rifa[®]검사에 사용된 100개의 균주를 이용하여 *rpoB* 유전자의 염기서열분석을 시행하였다. 검체불량으로 결과 확인이 불가능했던 4 균주를 제외한 96 균주 중 2개의 균주에서 돌연변이가 없었다. 따라서 94개의 균주에서 특정 돌연변이가 확인되었으며 그 중 5 균주는 동시에 2개의 돌연변이를 가지고 있어 총 99개의 돌연변이가 확인되었다.

REBA MTB-Rifa[®]검사결과와 비교하였을 때 염기서열 분석에서 Ser531TTG(Leu) 돌연변이로 나타난 한 균주가 REBA MTB-Rifa[®]검사에서는 wt5에 돌연변이가 있는 것으로 확인되어 단지 한 균주에서 결과가 불일치하였다.

염기서열결정법에 의해 확인된 돌연변이의 부위 빈도는 531번 코돈, 526, 533, 516번 순이었으며 Ser531TTG(Leu)가 전체의 45.5%(45/99)를 차지하였다(Table 4). 531 코돈의 돌연변이는 돌연변이 종류에 관계없이 항상 RBU 내성과 연관이 있었고, 513 코돈의 돌연변이도 한 균주(Gln513Glu)를 제외하면 모두 내성과 연관되었다. 반면, 526 코돈의 돌연변이는 돌연변이 종류에 따라 RBU 감수성 혹은 내성을

나타내었다(Table 4).

약제감수성 검사 결과를 기초로 하여 RBU에 내성을 갖는 것으로 보이는 내성 돌연변이는 다음과 같다(Table 4); Ser531Leu, Ser531Trp, Ser531Phe, His526Tyr, His526Arg, His526Gly, His526Asp, His526Pro, Gln513Pro, Gln513Lys, Gln513His, Leu530Met. 반면에 RFP에는 내성이나 RBU에는 감수성과 관련되는 돌연변이는 다음과 같다(Table 4); His526Gln, His526Leu, Leu533Pro, Asp516Tyr, Asp516Val, Asp516Gly, Gln513Glu, Leu511Pro.

상기 내성 및 감수성 돌연변이를 약제감수성 검사와 비교하였을 때 감수성 돌연변이일 때 약제감수성 검사에서도 감수성을 나타낼 민감도는 71.4%(20/28), 내성 돌연변이일 때 약제감수성 검사에서도 내성을 나타낼 특이도는 92.9%(66/71)였다(Table 5).

고 찰

다제내성 결핵은 균음전 후 18개월 이상의 오랜 치료 기간, 상대적으로 높은 부작용과 이에 따른 높은 치료중단을 등으로 완치율이 50%정도에 그치고 있는 실정으로 현재 세계적으로 결핵관리의 큰 위협으로 대두되고 있다. 우리나라에 과거력이 없는 신환자를 대상으로 한 다제내성률 조사에 따르면 1994년의 1차 조사에서 1.6%, 1998-1999년의 2차 조사에서 2.2%, 그리고 2003년의 3차 조사에서 2.4%로 통계적인 차이는 없었지만($p=0.0654$), 유의한 증가 수준에 근접하는 양상을 보여주었다¹⁸. 따라서 우리나라에서도 다제내성 결핵의 관리가 효과적으로 이루어 지지 않고 있으며 국가결핵관리에 큰 위협이 되고 있음을 알 수 있다.

1970년대 RFP이 항결핵약제로 도입된 이래로 새로운 항결핵약제의 개발이 요원한 상황에서 다제내성 결핵의 치료에 최근 새로운 quinolone제제 및 기존 항생제 중에서 항결핵 효과가 있는 것으로 보고되는 몇몇 약물들이 사용되기 시작하였다. 그 중 rifamycin S의 반합성 유도체인 RBU은 일부 RFP 내성 균주에 효과가 있는 것으로 보고되었으나 고가의 약값과 함께 RFP과의 교차내성이 다제내성 결핵에 대한

RBV의 사용에 제약이 되고 있다.

지금까지 보고된 국내의 교차내성률을 살펴보면 심 등⁹이 90%로, 류 등¹⁰이 79.6%로 보고하여 둘 사이에 적지 않은 차이를 보이고 있다. isoniazid와 rifampin을 제외하면 항결핵제 감수성검사 결과의 재현성이 낮은 것으로 알려져 있으며 두 연구에서 사용한 RBV의 내성기준농도가 서로 상이하였기 때문에 실제 국내의 교차내성 현황을 알기 어려웠다. 따라서 본 연구를 통하여 실제 현황에 근접한 교차내성률을 위한 자료를 제공하고자 하였으며 본 연구에서 나타난 두 약제간의 교차내성률은 70.5%였다. 이는 기존의 국내 보고들에 비하여 다소 낮았다. 심 등은 RBV 내성판정시 RFP 내성 기준농도의 1/4을 기준으로 삼았기 때문에 교차내성률이 높았던 것으로 사료되며 대상균주가 52개로 적었던 한계가 있다. 류 등은 본 연구에서와 같이 RFP 내성 기준농도의 1/2을 기준으로 삼았고 대상 균주도 200개 이상으로 많아 본 연구의 결과와 유사했던 것으로 사료되며 본 연구 결과와 함께 고려하면 국내에서의 교차내성률은 약 70%대일 것으로 추측된다. 현재까지 고체배지에서 RBV의 내성 기준농도는 논란이 많다. 한천배지를 사용하는 비울법에서는 RFP 기준농도의 1/2인 0.5µg/ml를 내성 기준농도로 정하고 있으나 일부 연구자들은 1.0-2.0µg/ml의 농도를 포함해서 검사하고 있으며 특히, RFP 내성의 경우에는 이러한 농도에서의 임상적인 의미에 대해서 알려져 있지 않다¹⁹. 따라서 고체배지에서의 RBV 내성 기준농도를 비울법에 근거하여 사용하기 보다는 많은 균주들을 대상으로 한 MIC실험과 RBV를 투약 받은 환자들의 임상경과와의 연관성 조사 등을 통하여 실제 임상적인 의의를 갖는 농도를 결정할 필요가 있겠다.

본 연구에서 *rpoB* 유전자의 염기서열분석과 함께 기존의 연구와 달리 RFP 내성확인에 사용하는 신속 검사인 REBA MTB-Rifa[®] 검사를 시행하였다. 현재 RFP 내성검사에 신속검사법이 널리 사용되고 있으며 따라서 이 검사법에 의한 RBV 내성유무의 진단이 어느 정도 임상에 유용한지를 추가로 알아보고자 하였다. 이 검사로 총 100개의 균주 가운데 98개의 균주에서 *rpoB* 유전자에 돌연변이가 존재함을 알 수 있

었고 따라서 약제감수성 검사의 결과와 98% 일치함을 알 수 있었다. 하지만 REBA MTB-Rifa[®] 검사만으로는 RBV의 내성유무를 아는데 한계가 있었다. 이는 REBA MTB-Rifa[®] 검사법을 이용한 RFP의 내성 진단은 *rpoB* gene의 돌연변이가 유무에 의해 단순히 결정될 수 있지만 RBV은 돌연변이의 양상에 따라 내성 및 감수성이 결정되기 때문이다. 본 연구에 사용된 REBA MTB-Rifa[®]는 단지 세 개의 특이 돌연변이만을 확인할 수 있는데 이중 TCG531TTG의 변이는 실험에 사용된 모든 다제내성 결핵 균주 가운데 41%를 차지하였으나 CAA513CCA와 GAC516GTC는 각각 2 균주에서만 발견되어 전체의 4.2%에 불과하였다. 염기서열분석에 의하면 가장 많은 돌연변이 양상은 역시 TCG531TTG로 41.1%였고 CTG(Leu)533CCG-(Pro), CAC(His)526TAC(Try)가 각각 13.2%와 12.1%로 나타나 세 개의 돌연변이가 전체 돌연변이의 66.4%를 차지하였다. 따라서 REBA MTB-Rifa[®]의 특정 돌연변이 probe들 중 빈도가 작은 것으로 나타난 513CCA와 516GTC 대신에 533CCG와 526TAC를 531TTG와 함께 사용한다면 대략 2/3의 균주들에 대해서는 RBV에 대한 내성유무를 알 수 있을 것으로 기대된다. LiPA 검사는 본래 RFP 내성확인을 위해 시행되는 검사인 것을 감안하면 이러한 추가적인 이득은 의미가 있는 것으로 사료된다. 다만, 본 실험대상 균주들이 국내의 균주들을 대표할 수 있다고 할 수는 없기 때문에 국내의 돌연변이 양상이 실제로도 본 연구의 빈도와 유사하게 나타나는지에 대한 추이를 지켜보는 것이 필요하다. 지금까지의 보고에 의하면 TCG531TTG와 CAC526TAC의 변이는 그 빈도가 높으나 CTG533CCG 변이는 상대적으로 드문 것으로 알려져 있어 특히, CTG533CCG의 빈도에 대해 유의할 필요가 있겠다.

염기서열 분석을 통해 나타난 각 돌연변이양상을 약제감수성 검사에 따라 내성과 감수성으로 구분하였을 때 531 코돈의 돌연변이(Ser531Leu, Ser531Trp, Ser531Phe)들은 모두 내성과 관계되었고 Gln513Glu를 보인 한 균주를 제외하면 513 코돈의 돌연변이 역시 돌연변이 양상(Gln513Pro, Gln513Lys, Gln513His)에 관계없이 모두 내성과 연관되었다. 하지만 돌연변

이의 양상과 그 균주의 RBU에 대한 MICs와의 상관관계는 보이지 않았다. 526 코돈의 돌연변이는 그 양상에 따라 내성과 연관(His526Tyr, His526Arg, His526Gly, His526Asp, His526Pro)될 수도 있고, 감성과 연관(His526Gln, His526Leu)될 수도 있었다. 위와 같은 결과는 기존의 보고와 일치하였다¹¹. 다만 감수성 돌연변이로 알려진 516 코돈의 돌연변이는 그 빈도가 낮아 확인이 어려웠다. 즉, 같은 돌연변이를 갖는 균주들임에도 불구하고 균주에 따라 내성 및 감수성 모두를 보였기 때문이다. 예를 들어 Ser531Leu 돌연변이를 갖는 대부분의 균주들은 RBU에 내성을 보여 내성 돌연변이로 확인할 수 있었지만, Asp516Tyr, Asp516Val, Asp516Gly와 같이 빈도가 적은 돌연변이에서 감수성과 내성이 유사하게 나오는 경우는 그 돌연변이가 RBU 감성 돌연변이인지 내성 돌연변이인지 판단하기 어렵다. 본 연구에서는 지금까지 보고^{10,11}에 근거하여 516 코돈의 돌연변이들은 모두 감수성 돌연변이로 판단하였다. 대개 동일 돌연변이라고 한다면 RBU에 대해 내성 혹은 감수성 중 어느 것 하나와 연관되어야 하나 다른 연구들^{10,11,13}에서와 같이 약제감수성 결과는 서로 다르게 나오는 경우가 몇 있었다. 이에 대한 이유로는 알려진 돌연변이 외의 다른 내성 기전이 존재한다거나 동일한 돌연변이를 갖고 있는 균주라고 할지라도 균 주변의 미세환경에 따라 감성 및 내성의 특성을 갖는 것이 아닌가 하는 의문이 있지만 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서도 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상에 따른 RBU에 대한 내성유무를 약제감수성 검사와 비교하였을 때 민감도는 71.4%(20/28), 특이도는 92.9%(66/71)로 낮게 나타나 *rpoB* 돌연변이 확인을 통한 RBU의 내성유무에 대한 판정에는 다소의 제약이 있음을 보여주었다.

결론적으로, 전통적인 약제감수성 검사를 통하여 RFP에 내성이지만 RBU에는 감성인 균주가 상당부분 존재함을 다시 한 번 확인하였다. 그러나 *rpoB* 유전자 검사를 이용하여 RBU에 감성인 RFP 내성 균주를 진단하기에는 아직 한계점이 있다. 따라서 다제내성 환자에게 RBU를 사용하기 위해서는 우선 RBU에 대한 전통적인 약물감수성 검사를 도입하여 적절한

내성기준농도를 확립하는 노력이 선행되어야 하며 일부 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상이 전통적인 약물내성검사 결과와 잘 일치하므로 이러한 부위는 기존의 검사법에 추가하여 임상적 사용을 고려할 수 있겠다. 이를 바탕으로 RBU로 치료한 환자들의 임상경과에 대한 연구가 이루어진다면 다제내성 결핵환자들에게 보다 효과적인 RBU의 사용이 가능하게 될 것이다.

요 약

목 적 :

RFP과 RBU 사이의 교차 내성률은 다양하게 보고되고 있으며 *rpoB* 돌연변이가 이에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 본원에서 동정되어 보관 중인 다제내성 결핵균주를 대상으로 하여 두 약물간의 교차 내성률 및 *rpoB* 돌연변이와의 연관성을 조사함으로써 다제내성 결핵의 치료에 있어 RBU의 효용성에 대하여 알아보고자 하였다.

방 법 :

2004년 한 해 동안 본원 검사실에서 다제내성 결핵균으로 동정되어 보관 중인 130균주를 대상으로 하였다. RFP과 RBU의 내성검사는 L-J 배지를 이용한 절대농도법으로 시행하였으며 추가로 다음과 같은 다섯 가지의 농도를 이용하여 RBU의 MICs를 조사하였다; 10, 20, 40, 60, 120µg/ml. 내성기준농도는 RFP의 경우 40µg/ml, RBU의 경우 20µg/ml로 하여 내성유무를 판정하였다. *rpoB* 돌연변이는 LiPA법을 이용한 REBA MTB-Rifa[®]검사로 조사하였으며 염기서열분석을 의뢰하여 그 결과를 검증하고 구체적인 개별 돌연변이양상을 알아보았다.

결 과 :

RFP은 모두 내성으로 확인되었고 RBU의 MIC₅₀은 80µg/ml, MIC₉₀은 ≥160µg/ml였으며 RFP과 RBU간의 교차내성률은 70.5%였다. REBA MTB-Rifa[®]검사 결과 *rpoB* 돌연변이는 대부분 코돈 524-534 사이에서 발생하였고 검사를 시행한 100균주 가운데 98개의 균주에서 돌연변이가 확인되어 RFP내성을 진단할 수 있는 진단율은 약물감수성검사와 비교하여 98%의 일치율을 보였다. 염기서열분석결과 코돈 531과 513

의 돌연변이는 돌연변이의 양상에 관계없이 항상 RBU내성과 관련되어 있었던 반면 코돈 526의 돌연변이는 돌연변이의 양상에 따라 내성 혹은 감성과 관련되어 있었다. 가장 흔한 돌연변이는 Ser531Leu로 전체의 45.5%를 차지하였다. 약물감수성검사에 비추어 His526Gln, His526Leu, Leu533Pro, Gln513Glu, Leu511Pro가 감성 돌연변이로 판단되었다.

결 론 :

두 약제간의 내성률을 고려하여 볼 때 RBU은 일부 다제내성 결핵의 치료에 있어서 효과가 있겠다. 우선 RBU에 대한 전통적인 약물감수성 검사를 도입하여 적절한 내성기준농도를 확립하는 노력이 필요하며 현재까지 *rpoB* 유전자 검사법은 임상에 적용하기에 한계가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구에 귀한 조언을 해주신 울산대학교 서울아산병원 호흡기내과 심태선 선생님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Woodley CL, Kilburn JO. In vitro susceptibility of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* strains to a spiro-piperidyl rifamycin. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:586-7.
2. O'Brien RJ, Lyle MA, Snider DE Jr. Rifabutin (ansamycin LM 427): a new rifamycin-S derivative for the treatment of mycobacterial disease. *Rev Infect Dis* 1987;9:519-30.
3. O'Brien RJ, Geiter LJ, Lyle MA. Rifabutin (ansamycin LM 427) for the treatment of pulmonary *Mycobacterium avium* complex. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:821-6.
4. Ji B, Truffot-Pernot C, Lacroix C, Raviglione MC, O'Brien RJ, Olliaro P, et al. Effectiveness of rifampin, rifabutin, and rifapentine for preventive therapy of tuberculosis in mice. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1541-6.
5. Chien HP, Yu MC, Ong TF, Lin TP, Luh KT. In vitro activity of rifabutin and rifampin against clinical is

6. olates of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2000;99:408-11.
6. Uzun M, Erturan Z, Ang O. Investigation of cross-resistance between rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:164-5.
7. Saribas Z, Kocagoz T, Alp A, Gunalp A. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by heteroduplex analysis and determination of rifamycin cross-resistance in rifampin-resistant isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:816-8.
8. Senol G, Erbaycu A, Ozsoz A. Incidence of cross resistance between rifampicin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* strains in Izmir, Turkey. *J Chemother* 2005;17:380-4.
9. Shim TS, Kim JS, Park MS, Lim CM, Lee SD, Koh YS, et al. Rifabutin susceptibility and *rpoB* gene mutations in multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Respir Dis* 2000;48:853-69.
10. Lew WJ, Park YK, Kim HJ, Chang CH, Bai GH, Kim SK. The proportion of rifabutin-susceptible strains among rifampicin-resistant isolates and its specific *rpoB* mutations. *Tuberc Respir Dis* 2005;59:257-65.
11. Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirakata Y, et al. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:621-8.
12. Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangaharam PRJ, et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1853-7.
13. Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgic A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Clin Microbiol Infection* 2004;10:662-5.
14. Telenti A. Genetics of drug resistance in tuberculosis. *Clin Chest Med* 1997;18:55-64.
15. de Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinckx L, Rossau R, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tubercle Lung Dis* 1995;76:425-30.
16. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2054-8.

17. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler H, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ 1969;41:21-43.
 18. Bai GH. Anti-tuberculosis drug resistance in Korea. CDMR 2005;16:101-7.
 19. NCCLS. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved standard.
-