

□ 원 저 □

Rifampin 내성 결핵의 진단에서 INNO-LiPA 검사법의 임상적 의미

연세대학교 의과대학 내과학교실, 진단검사의학과교실*

장윤수, 김 영, 이창률, 최종락*, 김형중, 안철민, 김성규

=Abstract=

Clinical Meaning of INNO-LiPA Test in the Diagnosis of Rifampin Resistant Tuberculosis

Yoon Soo Chang, M.D., Young Kim, M.D., Chang Youl Lee, M.D.,
Jong Rak Choi, M.D.*, Hyung Jung Kim, M.D.,
Chul Min Ahn, M.D., Sung Kyu Kim, M.D.

*Department of internal medicine, and laboratory medicine**
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The prevalence of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), resistant to isoniazid (INH) and rifampin (RFP), was 5.3% worldwide in 1995 and its increment has raised important public health problems. Resistance to RFP, one of the key drugs in the treatment of tuberculosis, results in grim clinical outcome. Recently rapid detection of RFP-resistant mutations in *rpoB* gene based on PCR method has become available. This study evaluated the prevalence of RFP resistance in first diagnosed, treatment failure, and recurred patients using INNO-LiPA test, and compared the results of INNO-LiPA with those of conventional mycobacterial drug susceptibility test.

Methods : Forty-six patients, who were diagnosed of pulmonary tuberculosis and had revealed positive sputum AFB smear, were enrolled in this study from 1998 to 2002. The cases were classified as one three groups; first diagnosed, treatment failure, or recurred. RFP resistance was studied using an INNO-LiPA Rif. TB kit and compared with that obtained from drug susceptibility based on M. tuberculosis culture study.

Results : Twenty-one out of 46 patients were enrolled under first diagnosis of pulmonary tuberculosis,

Address for correspondence :

Hyung Jung Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine

146-92, Dogok-Dong, Kangnam-Ku, Seoul 135-270, Korea

Phone : 02-3497-3316 Fax : 02-3463-3882 E-mail : khj57@yumc.yonsei.ac.kr

17 under treatment failure with first line drugs, and 8 under recurrence. The positive and negative predictive values of INNO-LiPA test in diagnosis in RFP resistant tuberculosis compared with conventional mycobacterial drug susceptibility test were 85.7% and 76.0%, respectively. INNO-LiPA result revealed *rpoB* gene mutation in 20 (80.0%) out of 25 patients who were diagnosed as treatment failure or recurrence, but in only 4 (19.0%) out of 21 patients who were first diagnosed as pulmonary tuberculosis.

Conclusion : This study showed that RFP resistance could be diagnosed rapidly and accurately using INNO-LiPA test and that this test might be helpful for choosing second line anti-mycobacterial drugs. It might be of great help in clinical diagnosis and decision when used in complimentarily with drug susceptibility test based on *M. tuberculosis* culture. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003, 55:344-352)

Key words : rifampin resistant *M. tuberculosis*, INNO-LiPA test

서 론

사하라 사막 이남 아프리카와 구 소비에트 연방 지역과 같이 타 지역 보다 높은 발병률을 보이는 국가들을 제외하고서도 전세계적으로 결핵의 발병률은 매년 0.4%씩 증가하고 있는 실정이다. DOTS (Directly Observed Treatment Short Course)을 시행하고 있는 국가들에서도 매년 2,400,000명의 새로운 결핵 환자가 발생하고 있으며 1,200,000 명의 객담 도말 양성 환자가 발생하고 있는 실정이다¹.

항결핵 화학요법이 도입될 당시에는 3% 미만의 환자가 약제 내성균에 감염되어 있었고, 약제 내성 양상도 한가지 약제에만 내성을 보이는 경우가 대부분 이었다², 국내 보고에 의하면 1995년 초치료 환자의 경우 5.5%, 재치료 환자의 경우 25.0% 가 1제 이상의 약제에 내성을 보이고 있다³. Rifampin의 경우 1980년도 초반 우리나라에 도입될 당시 1.7%가 내성을 보이고 있었으나, 1995년의 보고에 의하면 그 빈도가 5.3% 로 증가하였을 뿐 아니라 isoniazid와 동시에 내성을 갖는 다제내성 결핵이 5.3%, isoniazid 및 pyrazinamide와 동시에 내성을 갖는 다제내성 결핵이 2.3% 에 달하는 실정이다³.

약제 내성 결핵은 임상적 및 방사선학적으로 비 특이적이므로 진단과 치료 목적으로 약제 감수성 검사가 필수적이다. 하지만 기존의 고형 배지를 사용한 약제 감수성 검사의 경우 결과 확인에만도 약 2~4개월이 소요되어 진단이 늦어짐과 동시에 적절한 항결핵약제 치료가 이루어지지 않아 지속적인 내성균 감염원이 됨과 동시에 환자의 예후에도 바람직하지 않다. 이러한 다제내성 결핵은 높은 사망률과 함께 사망까지의 평균 기간이 4~16 주에 불과하며⁴, AIDS와 같은 면역기능이 저하된 환자에서 더욱 나쁜 예후를 보이고 있다. 그러나 다제내성 결핵균에 감염된 환자라도 내성검사서 감수성이 있는 것으로 판명된 2가지 이상의 약제로 조기에 적절한 항 결핵 화학요법을 시작한다면 좋은 치료성적을 보이고 있어⁵ 빠른 진단과 적절한 치료약제의 선택이 필수적이라고 하겠다. RFP은 RNA polymerase를 구성하고 있는 4개의 subunit 중 β subunit (*rpoB*)에 결합하여 mycobacterium RNA의 전사과정을 억제하는데⁶ *rpoB*의 중심부에 위치하고 있는 염기 서열의 돌연 변이에 의해 RFP과 *rpoB*의 결합력이 방해 받음으로써 약제내성이 생긴다⁷. 최근의 연구 결과에 의하면 RFP 내성 결핵

균주의 96-98%에서 *rpoB* gene의 81-bp core 영역의 염기 서열 변이가 관찰되었다⁸. *rpoB* 유전자 돌연변이에 대한 연구는 초창기의 polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), 자동화 염기 서열 결정법 등을 거쳐, 최근에는 DNA chip과 INNO-LiPA 검사법(Innogenetics, Belgium)이 이용되고 있다^{9,10,11-15}.

본 연구는 현재 상품화 되어 일부 국내 병원에서 사용되고 있는 INNO-LiPA 검사법(Innogenetics, Belgium)을 이용하여 1998년부터 2002년까지 본원에 내원한 폐결핵 환자들을 대상으로 RFP 저항성의 빈도를 초치료 환자, 재발 환자 및 초치료 실패 환자에서 알아보고 이 검사법으로 얻어진 결과를 결핵균 배양을 이용한 약제 감수성 결과와 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

1998년부터 2002년까지 폐결핵으로 영동 세브란스 병원에 내원한 환자들 중 객담 도말 검사상 양성인 환자들 46명을 대상으로 전향적 검사를 시행하였다. 대상 환자들의 나이는 평균 43.2세 이고, 35명이 남자, 11명은 여자였다. 대상 환자들은 1) 폐결핵을 처음으로 진단 받은 초치료군, 2) 치료 시작 후 4개월까지 객담 도말 검사상 균 음전 되지 않은 초치료 실패군 3) 완치 판정 후에 재발한 군으로 나누어 비교 분석하였다.

2. 연구방법

1) 검체 처리

50ml 시험관에 약 10ml의 객담 검체, 동량의 N-acetyl-L-cysteine, 5% NaOH용액을 담아서 20초간 vortex로 혼합한 뒤 15분간 실온에 방치하였

다. 멸균 증류수를 시험관 입구 1cm 아래까지 채운 뒤에 3,000rpm 으로 15분간 원심 분리한 뒤 침전물을 DNA 추출에 사용하였다.

2) INNO-LiPA 검사

INNO-LiPA검사는 INNO-LiPA Rif. TB kit(Innogenetics N.V., Ghent, Belgium)를 이용 제조사의 지시대로 시행하였다. 간략하면 Amplicor Respiratory Specimen Preparation kit (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ)을 이용하여 DNA를 추출하였다. Biotin이 결합된 상태로 증폭된 이차 중합효소 연쇄반응 산물 10 μ l와 변성 액 10 μ l를 흡통에 분주하여 20~25℃로 5분간 예비 반응시킨 후, 37~62℃로 예열된 교잡액 1ml를 가하여 섞은 뒤 INNO-LiPA strip을 삼가게 하여 진탕 항온수조에서 62℃로 30분간, 약 80rpm속도로 진탕하면서 교잡 반응시켰다. 시발체는 (sense) 5'-GGTCGGCATGTTCGCGATGG-3', (anti-sense) 5'-GCACGTTCGCGACCTCCAGC-3'를 사용하였다. 스트립이 잠겨있는 변성액과 교잡액을 제거한 뒤, 37~62℃로 예열된 세척액 1ml를 가하여 10~20 초간 흔들며 주면서 세척하고, 반복 세척 후 세척 액을 가하여 62℃에서 10분간 항온수조에서 진탕하면서 세척 시켰다. 헹굼액 1 ml로 1분간 씩 2회 헹군 후 1:100으로 희석된 conjugate액 1ml를 분주하여 진탕 교반기로 약 160 rpm의 속도로 진탕하면서 20~25℃에서 30분간 반응시켰다. Conjugate액을 제거하고 기질 완충액(substrate solution) 1ml를 가하여 진탕하면서 20~25℃에서 30분간 더 반응시킨 후 스트립을 건져 건조시켰다. 이후 전상대조 스트립과 비교하여 밴드의 양상을 분석하였다.

3) 통계 분석

각 대상 연구군 간 연속변수의 비교 분석에는 one-way ANOVA를 이용하였으며 범주형 변수의

비교 분석에는 Pearson's χ^2 -검사법을 이용하여 비교 분석하였다. *P*-value 는 2-side test 를 이용한 결과에서 얻어진 값을 사용하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특징.

1998년부터 2002년까지 폐결핵으로 본원에 내원한 환자들 중 객담 도말 검사상 양성인 환자들 46명을 대상으로 전향적 검사를 시행하였다. 대상 환자들의 나이는 평균 43.2세 이고, 35명이 남자, 11명은 여자 이었다(Table 1). 이들 환자들 중 8 (17.4 %) 명은 완치 판정 후에 재발되어 내원한 환자이였으며, 17 (47.0 %) 명은 치료 후 4개월까지도 객담 도말 검사상 균 음전 되지 않아 초치료 실패 환자이었고, 나머지 21 (45.7 %) 명은 폐결핵을 처음으로 진단 받은 초치료 환자 이었다(Table 1). INNO-LiPA test 검사를 시행한 이유는 치료 시작 4개월 째까지 방사선허적으로 호전없이 지속적으

로 결핵균이 검출된 경우가 가장 많았다.

2. *RpoB* 유전자의 돌연변이의 빈도와 분포

PCR 및 line probe assay를 이용한 INNO-LiPA kit를 사용하여 결핵균 동정과 RFP 내성균주의 조기 검출을 시도하였다. INNO-LiPA strip은 5개의 wild-type probe (S1-S5)와 흔히 발견되는 4가지 mutant probe(R2, R4a, R4b, R5)로 구성되어 있으며 wild-type band의 소실로서 돌연변이가 발생하였음을 알 수 있으며 RFP 내성 균주를 확인할 수 있다. 본 실험에 사용된 S-probe region의 염기서열과 codon은 Telenti 등의 명명법에 따랐다¹⁶(Fig. 1). 자세한 codon과 염기 서열의 돌연 변이, 위치, 및 해석은 Rossau 등에 기술되어 있다¹⁷. 초치료 실패 또는 재발 환자 25명 중 20 (80.0%)명 에서 *rpoB* mutant *M. tuberculosis*가 발견된 반면 대조군인 처음으로 폐결핵을 진단 받은 환자 21명 중 4 (19.0%) 명에서만 *rpoB* gene의 돌연 변이가 관찰되었다. *rpoB* 돌연변이를 가진 24 증례에서, S1

Table 1. Demographic characteristics of the study patients

		First diagnosed group (n=21)	Treatment failure group (n=17)	Recurrent group (n=8)	<i>P</i> -value
Age		44.0±12.35	41.0±18.71	45.8±11.25	
Gender	Male	17	13	5	
	Female	4	4	3	
Results of INNO-LiPA	No mutation	17	1	4	<0.001
	S1 mutation	1	1	0	
	S2 mutation	0	0	1	
	S3 mutation	0	0	0	
	S4 mutation	1	7	1	
	S5 mutation	2	8	2	
Resistance of first line drug	Isoniazid	3	13	6	<0.001
	Rifampin	4	11	6	
	Ethambutol	2	4	2	<0.001
	Pyrazinamide	0	7	4	
	Streptomycin	1	6	2	

Table 2. Comparison of results of INNO-LiPA test with drug susceptibility results

Rifampin Sensitivity			Susceptible	Resistant	<i>P</i> -value
Results of INNO-LiPA					
No mutation			19	3	
<i>rpoB</i> mutation	S1 mutation	0	2		<0.001
	S2 mutation	0	1		
	S3 mutation	0	0		
	S4 mutation	3	6		
	S5 mutation	3	9		

P-value was obtained by pearson's chi-square test.

5. INNO-LiPA 검사와 약제 감수성 검사의 비교 분석.

배양 검사를 이용한 약제 감수성 검사법을 기준으로 하여 비교시 INNO-LiPA 검사법을 이용한 RFP 저항성의 양성 예측율은 85.7% 이었으며 음성 예측율은 76.0%이었다. 위음성을 보다 위양성율이 약 1.7 배 상대적으로 높으며 위양성은 모두 S4 및 S5 돌연 변이에서 관찰되었다. 대조군의 경우에 있어서 위양성율이 5.9% 이었던 반면, 초치료 실패 및 재발 환자군에 있어서는 위양성이 62.5%로 높은 편이었다. S1 및 S2 region의 돌연 변이는 상대적으로 발생 빈도가 낮으나 이 부분의 돌연 변이는 RFP 저항성을 정확히 예측할 수 있었다(Table 2).

고 찰

INNO-LiPA결과와 *rpoB* 유전자의 염기 서열 분석(direct sequencing) 결과의 일치율은 100%에 달하는 것으로 알려져 있으며 S1부터 S5까지의 탐침 중 S2 만이 *M. avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, 및 *M. scrofulaceum*과 같은 다른 *Mycobacterium* 속의 균주와 교차 반응할 수 있다고 알려져 있어 INNO-LiPA 검사법은 *M. tuberculosis*의 RFP내성을 진단하는데 신속하고 유용하게 사용될 수 있

다¹⁷⁻¹⁸.

본 연구는 1998년부터 2002년까지 폐결핵 의심 하에 내원한 환자들 중 객담 도말 검사상 양성인 환자들을 대상으로 한 전향적 연구이다. 폐결핵을 처음 진단받고 치료를 시작한 21명의 대조군에서 MDR-TB의 유병율이 14.3% 이었으며 이는 3차 의료가관에서 시행한 결과라는 점과 적은 수의 집단을 대상으로 하여 selection bias를 고려하여야 하나 1995년의 전국 결핵실태조사의 5.3%에 비하여 높은 수치로 치료에 잘 반응하지 않는 초치료 환자에는 MDR-TB 가능성에 대하여 주의가 필요할 것으로 생각된다. 이러한 MDR-TB의 유병율은 초치료 실패 환자에서는 64.7%, 그리고 재발환자에서는 75.0%에 달하였으며 따라서 초치료 실패 및 재발 환자는 MDR-TB의 고 위험군으로 간주하고 이의 신속한 진단과 치료 약제의 선택이 필요하며 이에 INNO-LiPA 검사를 통한 rifampin 내성을 확인함으로써 조속한 도움을 얻을수 있다.

RpoB gene의 돌연변이를 검출하는 방법으로는 PCR-SSCP, DNA sequencing, DNA chip, INNO-LiPA test등이 현재 사용 가능한 방법중의 하나이나 이미 상품화 되어 실험실에서 상용되고 있는 INNO-LiPA test가 가장 경제적인 측면과 신속한 점을 고려하면 임상영역에서 쉽게 시행할 수 있는 검사라 하겠다. 본 연구에서 전체 대상환자를 대상으로 한 분석에서 위음성율보다 위양성율이 약 1.7

배 상대적으로 높아 결과의 해석시 유의가 필요할 것으로 사료된다. 대조군의 경우에 있어서 위양성율이 5.9% 이었던 것에 비교하면 초치료 실패 및 재발 환자군에 있어서는 위양성이 62.5% 로 상대적으로 높은 편이었다. 이러한 위 양성은 모두 S4 및 S5 돌연 변이에서 관찰되었으며 따라서 초치료 환자에서 S4 또는 S5 region에 mutation이 관찰되면 위 양성의 가능성을 염두에 두고서 이의 해석에 신중을 기하여야 할 것으로 사료된다. 이에 비하여 S1 및 S2 region의 돌연변이는 RFP의 저항성을 정확히 예측할 수 있어 특이적임을 알 수 있었다.

치료 과정에서 일차 결핵 약제에 임상적으로 호전되지 않을 경우와 객담 도말 검사에서 균 음전 후 다시 양성으로 되거나 배양검사에서 4개월 때 양성인 경우에 내성균에 의한 감염일 가능성이 높음으로 INNO-LiPa test를 약제 감수성 검사와 동시에 시행하는 것이 다제 내성 결핵 환자를 조기에 발견하고 올바른 약제 투여를 신속하게 결정하는데 도움이 될 것이다. 하지만 전적으로 약제 내성 검사를 대체하기는 어려운 점이 많으며 보완적으로 사용하는 것이 바람직 할 것으로 여겨진다. 본 연구에서도 약제 내성이 의심이 되는 폐결핵 환자에서 INNO-LiPa 검사를 통해 신속히 약제 내성의 정보를 얻을 수 있었고 검사 결과 약제 내성이 의심되는 환자에게서 2차 약제의 선택에 도움을 주었다. 또한 INNO-LiPa 검사법이 기존의 배양 검사를 이용한 약제 감수성검사와 함께 상호 보완적으로 사용된다면 점차 늘어나고 있는 MDR-TB를 비롯한 치료가 어려운 결핵의 증례에서 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

Isoniazid와 rifampin에 내성인 다제내성 결핵의 유

병률은 1995년 세계적으로 5.3%이며 이의 지속적인 증가는 공중보건의 중요한 문제로 대두 되고 있다. 결핵 치료의 중요한 약물의 하나인 RFP에 대한 내성은 불량한 예후를 초래한다. 이에 RFP 내성을 조기에 정확하게 진단하는 임상적으로 중요하다. 최근 PCR 방법을 이용하여 약제 (RFP) 내성을 초래하는 변이를 신속하게 진단하는 방법이 가능하게 되었다. 본 연구는 결핵 초치료군, 치료 실패군 및 재발군에서 INNO-LiPa 검사법을 이용하여 RFP내성 유병률을 확인하고 기존의 약제 감수성 검사법을 이용하여 얻은 결과를 비교하여 INNO-LiPa검사의 유용성을 연구하였다.

방 법 :

1998년부터 2002년까지 본원에 내원하여 객담 도말 검사상 양성 소견으로 폐결핵으로 진단받은 46명을 대상으로 하였으며 환자는 초치료, 초치료 실패, 및 재발 환자군으로 분류하였다. RFP 내성은 INNO-LiPa Rif.TB kit을 이용하여 검사하였으며 이를 결핵균 배양을 이용한 약제 감수성 결과와 비교 분석하였다.

결 과 :

46명의 환자중에 21명이 결핵으로 처음 진단받은 환자였으며 17명이 초치료 실패한 환자였으며 8명이 재발한 환자였다. 배양 검사를 이용한 약제 감수성 검사법을 기준으로 하여 비교시 INNO-LiPa 검사법을 이용한 RFP 저항성의 양성 예측률은 85.7% 이었으며 음성 예측률은 76.0%이었다. INNO-LiPa 검사 결과 초치료 실패한 및 재발한 환자 25명의 환자중 20예 (80.0%)에서 *rpoB* gene의 변이를 보였으며 처음 결핵으로 진단받은 21명의 환자중 4예 (19.0%)에서 *rpoB* gene의 변이를 보였다.

결 론 :

INNO-LiPa 검사는 비교적 신속하고 정확하게 RFP 약제 내성 정보를 제공하여 2차 항결핵 약제의 선택에 도움을 준다. 아울러 기존의 배양 검사

를 이용한 약제 감수성 검사법과 함께 상호 보완적으로 사용하면 다제 내성결핵의 치료에 있어 그 유용성은 매우 클 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. WHO global tuberculosis control. WHO Report 2003. Geneva: WHO/CDS/ TB;2003.
2. Hobby GL, Johnson PM, Boytar-Papirnyik V. Primary drug resistance : a continuing study of drug resistance in tuberculosis in a veteran population in the United States. X. September 1970 to September 1973. Am Rev Respir Dis 1974;110:95-8
3. 보건복지부. 대한결핵협회. 제7차 전국결핵실태 조사 결과, 1995
4. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, Crawford JT, Williams J, Sordillo EM *et al*, An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1992;326:1514-21.
5. Telzak EE, Chirgwin KD, Nelson ET, Matts JP, Sepkowitz KA, Benson CA, *et al*. Predictors for multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected patients and response to specific drug regimens. Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA) and the AIDS Clinical Trials Group (ACTG), National Institutes for Health. Int J Tuberc Lung Dis. 1999;34: 337-43.
6. Hartmann G, Honikel KO, Knusel F, Nuesch J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. Biochim Biophys Acta 1967;145: 843-844.
7. Ovchinnikov YuA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF *et al*. Primary structure of Escherichia coli RNA polymerase nucleotide substitution in the beta subunit gene of the rifampicin resistant *rpoB* 255 mutant. Mol Gen Genet 1981;184:536-538.
8. Heep M, Brandstätter B, Rieger U, Lehn R, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Frequency of *rpoB* Mutations Inside and Outside the Cluster I Region in rifampin-resistant Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates. J Clin Microbiol 2001;39:107-110.
9. 박승규, 정황규. Cold-SSCP법에 의한 내성 결핵균 *rpoB* 유전자의 다형성 분석. 부산의대학술지 1996;36:199-214.
10. 박영길, 조상현, 심명섭, 배길한, 김상재, 송철용: Line Probe Assay를 이용한 결핵균의 rifampin내성의 신속 진단. 결핵 및 호흡기질환 1996;31:7-11
11. 서진태, 김문희, 최종원, 이희주, 강홍모. *Mycobacterium tuberculosis* rifampin내성과 관련된 *rpoB* 유전자 염기서열분석. 대한임상병리학회지 1996;16:78-90.
12. 심태선, 유철규, 한성구, 심영수, 김영환. 결핵균의 *rpoB* 유전자 PCR-SSCP법에 의한 Rifampicin내성의 신속 진단. 결핵 및 호흡기질환 1996;43(6):842-51.
13. 이미경, 박애자, 전희선: Line Probe Assay를 이용한 rifampin내성 결핵균의 조기검출. 대한임상병리학회지 1997;17:269-78.
14. 이민기, 김윤성, 이효진, 전두수, 윤상명, 박삼석 등. 염기 서열 결정과 Line Probe 분석법에 의한 Rifampin내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 분석. 결핵 및 호흡기 질환 1997;44(2):251-63.
15. 홍상범, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김동

- 순 등. Line probe assay를 이용한 신속한 rifampicin 내성결핵 진단법의 임상적 유용성 . 결핵 및 호흡기질환 2001;50:334-42.
16. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowerie D, Cole S, Colston MJ et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647-50.
17. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB Assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemothera 1997;41:2093-8
18. Bártfai Z, Somoskövi Á, Ködmön C, Szabó N, Puskás E, Kosztolányi E, et al. Molecular Characterization of Rifampin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA Sequencing and the Line Probe Assay. J Clin Microbiol 2001;39:3736-9
-