

□ 원 저 □

Line probe assay를 이용한 신속한 rifampicin내성결핵 진단법의 임상적 유용성

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실, 강원대학교 의과대학 내과학교실*

홍상범*, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김동순, 김원동, 심태선

= Abstract =

Clinical Usefulness of the Line Probe Assay for Rapid Detection of Rifampicin-resistant Tuberculosis

Sang-Bum Hong, 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. Tae Sun Shim, M.D.

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

Department of Internal Medicine, Kangwon National University College of Medicine, Chunchon*

Background : *RpoB* gene mutations have been found in about 96-98% of rifampicin (RMP)-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Recent reports confirm that the in laboratory settings a *rpoB* gene mutation can be used as a surrogate marker for multi-drug resistant tuberculosis. However, its usefulness in clinical applications has not been evaluated. This study was performed to confirm whether mutation analysis of the *rpoB* gene of *M. tuberculosis* is useful in clinical settings.

Methods : The medical records of 33 patients in whom *rpoB* gene analysis was conducted using an INNO-LiPA Rif. TB assay (LiPA) from June, 1998, to July, 2000, at the Asan Medical Center were retrospectively reviewed in 33 patients. The clinical characteristics in addition to the drug susceptibility and LiPA results were analyzed. The drug susceptibility test was considered as a gold standard method for *M. tuberculosis* susceptibility and these results were compared with those of the *rpoB* gene study and sequencing analysis. Sequencing analysis of the *rpoB* gene was done in cases where there was a discrepancy between the results of

Address for correspondence :

Tae Sun Shim, M.D.

Department of Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center

388-1 Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul, 138-600, Korea

Phone : 82-2-2224-3892 Fax : 82-2-2224-6968 E-mail : shimts@www.amc.seoul.kr

the drug susceptibility and *rpoB* gene study.

Results : The mean age and sex ratio was 42 ± 18 , and 24:9 (M:F), respectively. There were 19 RMP susceptible (58%) and 14 RMP-resistant cases (42%) according to the *rpoB* gene study. The mean time from the request to reporting the results of the *rpoB* gene study was 5.2 ± 2.6 days. The mean gap from reporting the *rpoB* gene study to reporting the susceptibility was 56 ± 35 days. Twenty-eight cases (85%) showed identical results compared with the drug susceptibility results, whereas five cases (15%) showed contradictory results. When compared with the sequencing analysis, of the five cases that showed contradictory results, two had LiPA analysis errors and the remaining three were identical to the sequencing results. The *rpoB* gene study was of assistance in choosing the appropriate drugs in 28 cases (85%).

Conclusions : An *rpoB* gene study using an LiPA assay was useful in rapidly diagnosing RMP-resistant tuberculosis, which enabled a proper choice of the appropriate drugs in clinical practices. However, an LiPA assay always should be performed in conjunction with microscopy, culture, and susceptibility tests. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 334-342)

Key words : *RpoB* gene, Rifampicin-resistant tuberculosis, Line probe assay.

서 론

국내에서 폐결핵의 유병율은 국가결핵관리사업의 결과 꾸준히 감소 추세에 있으나, 아직도 isoniazid (INH) 내성율이 9.2%, INH와 rifampicin(RMP) 동시내성인 다제내성율이 5.3%에 이를 정도로 높은 내성율을 보이고 있다¹. 다제내성결핵은 적절한 치료가 지연되면 항결핵약제를 복용하여도 반응이 없고 지속적으로 내성균의 감염원이 된다. 그러므로, 약제내성의 신속한 진단이 필수적임에도 불구하고 국내의 현실에서는 약제감수성검사에 고형배지를 사용함으로써 결과확인까지 약 2-4개월이 소요되고 있다.

최근 분자생물학의 급속한 발전으로 RMP내성에 관여하는 결핵균의 *rpoB* 유전자가 밝혀졌다. *rpoB* 유전자는 RNA polymerase의 β -subunit를 코딩하는 유전자로서 RMP내성결핵균의 96-98%에서 돌연변이가 발견된다²⁻⁴. *rpoB* 유전자의 돌연변이를 검출하여 신속하게 RMP내성을 진단할 수 있음이 보고되었으며, RMP내성 결핵균은 대부분 INH에도 내성이므로 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출을 이용한 RMP내성의 진단은 다제내성결핵의 신속한 진단법으로도 사

용할 수 있다. 지금까지 실험실 연구들에서 *rpoB* 유전자 돌연변이는 PCR-SSCP (single strand conformational polymorphism), 자동화 염기서열결정법 또는 DNA chip 등의 방법을 이용하여 검출하였고, 상품화되어 있는 INNO-LiPA Rif. TB kit (Innogenetics, Belgium, 이하 LiPA)을 이용하기도 하였다⁵⁻¹¹. 그러나 지금까지 연구는 대부분 실험실에서 시행된 연구이고, 직접 치료 중인 환자에서 *rpoB* 유전자 돌연변이 검출법의 진단적 가치 및 임상적 유용성을 평가한 보고는 없었다. 본 연구는 상품화되어 일부 국내 병원에서 환자의 진료에 직접 사용되고 있는 LiPA 검사의 임상적 적용결과를 분석하여 그 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

서울중앙병원에서 1998년 6월부터 2000년 7월까지 LiPA 검사를 시행한 37명의 환자를 대상으로 후향적분석을 시행하였다. 각 환자에서 채취되어 배양된

결핵균주의 항결핵약제감수성 결과를 확인하였으며, LiPA 결과와 약제감수성검사 결과가 불일치 하는 경우에는 *rpoB* 유전자의 염기서열분석을 시행하였다. 약제감수성검사는 대한결핵연구원에 의뢰하였다.

의무기록을 검토하여 LiPA 검사의뢰부터 결과보고까지의 소요시간, LiPA 결과와 약제감수성검사 결과 사이의 기간, 약제감수성 검사결과와의 일치율, 그리고 LiPA 검사결과 확인 후 담당의사가 LiPA결과에 따라 약제를 변경했는지의 여부를 조사하였다.

저자들은 임의로 치료 도중 임상 혹은 방사선허적으로 악화되어 내성결핵이 의심되는 경우, 과거에 2차 레 이상 1차 약제 결핵 치료력이 있으면서 다시 재발한 경우, 과거 치료횟수에 상관없이 1개월 이상 불규칙한 치료력이 있는 경우, 약제감수성 결과가 확인되었으나 임상적 경과와 일치하지 않는 경우, 그리고 다제내성결핵균에 의한 일차내성이 의심되는 경우에 LiPA법을 이용한 RMP내성 검사를 시행한 경우를 올바른 적응증으로 정하고, 이 기준과 비교하여 LiPA검사법이 얼마나 적응증에 맞게 사용되었는지를

분석하였다. 그리고 LiPA검사결과 확인 후 결과에 부합되게 약제를 변경하였거나(RMP내성인 경우는 다제내성으로 생각하고 2차 약제로 변경하고 RMP 감수성인 경우는 1차약제를 사용함) 또는 기존에 사용하던 약제가 LiPA검사 결과에 부합하여 담당의사가 계속 사용한 경우를 치료약제 선정에 도움이 된 경우로 평가하고 분석하였다.

1. 연구방법

1) 검체의 처리

50 ml 시험관에 약 10 ml의 객담검체와 10 ml의 NALC (N-acetyl-L-cysteine)-NaOH용액을 담아서 20초간 vortex mixer로 혼합하고 15분간 실온에 방치하였다. 멸균중류수를 원심분리관 입구 1 cm 밑까지 채운 뒤에 3,000 rpm 으로 15분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 침전물에 0.5 ml의 멸균중류수를 넣고 vortex mixer로 혼합한 후 DNA 추출에 사용하였다. 기관지폐포세척액과 같이 부유액으로 되

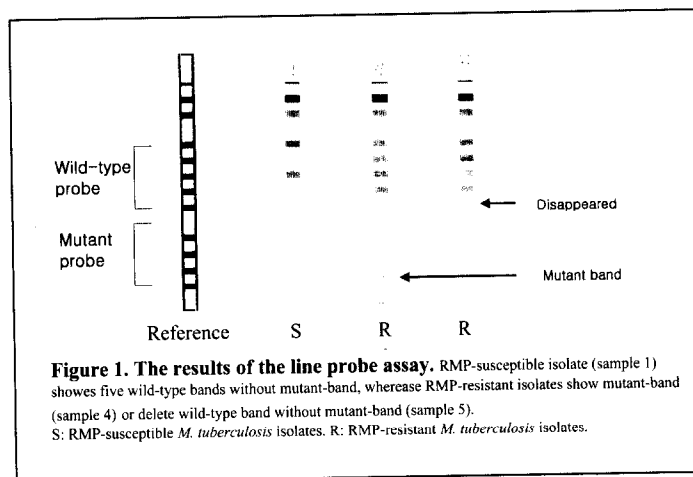


Fig. 1. The results of the line probe assay.

RMP-susceptible isolate (sample 1) shows five wild-type bands without mutant-band, whereas RMP-resistant isolates show mutant-band (sample 4) or delete wild-type band without mutant-band (sample 5).

S: RMP-susceptible *M. tuberculosis* isolates. R: RMP-resistant *M. tuberculosis* isolates.

이 있는 검체는 바로 DNA 추출에 사용하였다.

2) LiPA 검사 (Fig. 1)

Biotin이 결합된 상태로 증폭된 이차 PCR(중합효소 연쇄반응) 산물 10 μ l 와 변성액(denaturation solution) 10 μ l 를 홈통(trough)에 분주하여 20~25 $^{\circ}$ C로 5분간 예비 반응시킨 후, 미리 37~62 $^{\circ}$ C로 예열된 교잡액(hybridization solution)을 1 ml 가하여 섞은 뒤 LiPA 스트립을 잠기게 하여 진탕 항온수조에서 62 $^{\circ}$ C로 30분간, 약 80 rpm속도로 진탕하면서 교잡반응시켰다. 시발체는 5'-GGTCGGCATGTC-GCGGATGG-3', 5'-GCACGTCGCGGACCTCC-AGC-3'를 사용하였다. 스트립이 잠겨있는 변성액과 교잡액을 모두 제거하고 37~62 $^{\circ}$ C로 예열된 세척액(wash solution) 1 ml를 가하여 10~20초간 흔들어서 세척하고, 한 번 더 반복 세척 후 세척액을 가하여 62 $^{\circ}$ C에서 10분간 다시 진탕 항온수조에서 진탕하면서 세척시켰다.

헹굼액(rinse solution) 1 ml로 1분간씩 2회 헹군 후 1:100으로 희석된 conjugate액(conjugate solution) 1 ml를 분주하여 진탕 교반기로 약 160 rpm의 속도로 진탕하면서 20~25 $^{\circ}$ C에서 30분간 흔들어서 반응시켰다. Conjugate액을 제거하고 기질완충액(substrate buffer) 1 ml로 1분간 세척 후에 1:100으로 희석한 기질액(substrate solution) 1 ml를 가하여 진탕하면서 20~25 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 기질액을 제거하고 증류수 1ml를 가하여 진탕하면서 20~25 $^{\circ}$ C에서 30분간 더 반응시킨 후 스트립을 건져 건조시켰다. 이후 정상대조 스트립과 비교하여 밴드의 양상을 분석하였다.

3) 염기서열결정

(1) 결핵균 DNA의 추출

객담과 동량의 NALC-NaOH를 넣고 50ml plastic centrifuge tube에 옮겨서 충분히 vortex mix하고 실온에 15분간 방치하였다. 멸균증류수를 끝부분까지

넣고 섞은 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 배양된 균주의 경우에는 균집락을 따서 멸균증류수에 넣고 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 남아있는 침사액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한다음 상층액을 제거하였다. 상층액을 버리고 pellet을 멸균증류수로 세척하였다. 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하여 pellet을 모았다. pellet에 instagene matrix (Biorad, USA) 200ul를 넣어 잘 섞은후 heat block에서 56 $^{\circ}$ C, 30분간 반응시키고 10초 동안 vortex하였다. 잘 혼든뒤 100 $^{\circ}$ C heat block에서 8분간 반응시켰다. 다시 10초간 vortex한 후 12,000 rpm에서 3분간 원심시켰다. 상층액을 새 tube로 옮겨 PCR에 사용하였다.

(2) 중합효소연쇄반응

IS6110-S와 IS6110-AS 시발체를 이용하여 PCR을 시행하여 결핵균의 IS6110분절을 검출하였다. 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 68 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초씩 35 주기를 시행한 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 종료하여 123 bp의 증폭물을 확인하였다. IS6110분절에 대한 PCR검사상 양성으로 판명된 검체만을 대상으로 *rpoB* 유전자 염기서열결정법을 시행하였다. *rpo105*와 *rpo293* 시발체를 이용하여 PCR을 시행하여 215 bp 분절을 증폭하였다. 10 pmole/ul의 시발체 *rpo105*, *rpo293*를 각각 1 μ l 씩 넣고 DNA 1 μ l 를 넣은 후 17 μ l 의 증류수를 넣어서 최종 20 μ l 가 되게 하였다. 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 1분, 95 $^{\circ}$ C에서 30초씩 35 주기를 시행한 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 종료하였다. GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, California, USA)을 사용하였으며, 반응액은 20 μ l 용 PCR Pre-Mix Kit (Bioneer, Cheongwon, Korea)을 사용하였다. 사용한 시발체는 Bioneer (Cheongwon, Korea)에 의뢰하여 제조하였으며, 염기서열은 다음과 같다.

rpo105 : 5'-CGT GGA GGC GAT CAC ACC
GCA GAC GT-3'
rpo293 : 5'-AGT GCG ACG GGT GCA CGT
CGC GGA CCT-3'
IS6110-S : 5'-CCT GCG AGC GTA GGC
GTC GG-3'
IS6110-AS : 5'-CTC GTC CAG CGC CGC
TTC GG-3'

(3) 염기서열결정

ABI PRISM 373 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, California, USA)를 이용하여 자동염기서열 결정법을 실시하였다. 검체처리에는 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, California, USA)을 이용하였다. 정제된 PCR 증폭산물 10 ng/ μ l 와 rpo105 시발체 5 pmole, terminator ready reaction kit (Perkin-Elmer, California, USA), 50% DMSO, 그리고 증류수를 더하여 총 10 μ l 가 되도록 섞었다. 96 $^{\circ}$ C에서 20초 반응시킨 후, 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 4분의 조건으로 25회 실시하였다. 증폭산물은 에탄올을 이용하여 정제하였다. Microcentrifuge tube에 3 M sodium acetate (pH 4.8) 2 μ l 와 95% 에탄올 50 μ l 을 넣고, 검체 10 μ l 와 증류수 10 μ l 를 넣었다. 잘 섞은 후에 얼음에 10분간 방치후 14,000 rpm (VS-15000 CF; VISION SCIENTIFIC, Seoul, Korea)에서 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리한 후, 조심스럽게 상층액을 버렸다. 침전물에 70% 에탄올 250 μ l 를 첨가하여 원심시킨 후 상층액을 제거하고 공기 중에서 침전물을 건조시켰다. Deionized formamide와 25 mM EDTA (pH 8.0)를 5:1로 섞어 loading buffer를 준비하고, 검체 6 μ l 를 loading buffer와 섞어 원심시켰다. 90 $^{\circ}$ C에서 2분간 가열후 얼음에 두었다가 6% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다.

결 과

37명중에서 항결핵 약제감수성검사 결과가 확인된 33명을 대상으로 분석을 시행하였다(Table 1). 33명의 평균 나이는 42 \pm 18세, 남녀비는 24 : 9 이었으며, 18명(55%)에서 과거에 결핵치료의 병력이 있었다. LiPA 검사를 시행한 이유로는 치료 도중 임상 혹은 방사선허적으로 악화되어 내성결핵이 의심된 경우가 14예로 가장 많았고, 과거에 2차례 이상 결핵 치료력이 있으면서 재발한 경우가 5예, 과거 치료횟수에 상관없이 1개월 이상 불규칙한 치료력이 있는 경우가 4예, 확인된 약제감수성검사 결과가 임상적 경과가 일치하는 않았던 경우가 3예, 다제내성결핵균 감염에 의한 일차내성이 의심되었던 경우가 1예이었으며 6예에서는 LiPA 검사를 시행한 이유가 불분명하였다. 종합하면 27예(82 %)에서는 본 연구에서 임의로 정한 LiPA검사 적응증에 합당하였고, 후자 6예(18%)는 적응증에 맞지 않았다.

LiPA 검사 처방에서 결과 보고까지의 평균 시간은 5.2 \pm 2.6일 이었다. 후향적 검사이기 때문에 각 개인에서 LiPA검사와 전통적 약제감수성 검사를 의뢰한

Table 1. Characteristics of the study patients

Numbers	33	
Sex (M:F)	24:9	
Ages (yr)	42 ± 18	
Specimens	Cultured colony	17
	Sputum	13
	BAL	1
	Bronchial washing	1
	Pus	1
Previous history of TB	18	
Time from request to report of LiPA result (days)	5.2 ± 2.6	
Time gap between LiPA and susceptibility result (days)	56 ± 35	

Table 2. The comparison between drug susceptibility and LiPA assay

	LiPA(+) ¹	LiPA(-) ²	Total
RMP-resistant	10	1	11
RMP-susceptible	4	18	22
	14	19	33

¹LiPA(+) : presence of *rpoB* gene mutation in LiPA analysis.

²LiPA(-) : absence of *rpoB* gene mutation in LiPA analysis.

시기는 모두 달랐다. 약제감수성검사는 배양된 균을 이용하는 간접법으로 시행하였으므로 대부분 균 배양 후 검사가 의뢰되어서 치료시작 후 평균 49 ± 31 일 후에 의뢰되었다. LiPA검사는 8명에서는 치료 시작과 함께 의뢰되었고 25명에서는 치료경과 중에 의뢰되었다. 종합하여 LiPA검사 결과는 약제감수성검사 결과보다 평균 56 ± 35 일 빠르게 보고되었다.

LiPA검사상 19명(58%)은 RMP 감수성, 14명(42%)은 RMP내성으로 보고되었다. 33명 중 28명(85%)에서는 LiPA검사와 약제감수성검사 결과가 일치하였고, 5명은 불일치하는 결과를 보였다(Table 2). 결과가 불일치한 5명 중에서 4명은 약제감수성검사상 RMP 감수성이었으나 LiPA 검사상 RMP내성으로 판정되었다. 1명은 반대로 약제감수성검사상 RMP 내성이었으나 LiPA 검사상 RMP감수성으로 판정되었다. 약제감수성검사상 RMP감수성이었으나 LiPA검사상 내성으로 판정된 4명 중 3명은 임상적으로도 약제내성이 강력하게 의심되었고, 염기서열분석시 *rpoB* 유전자 돌연변이가 발견되어서 약제감수성검사의 오류로 생각되었다. 나머지 1명은 염기서열분석에서 *rpoB* 유전자 돌연변이가 없었으며 따라서 LiPA 검사결과의 오류로 생각되었다. 약제감수성검사상 RMP 내성이었으나 LiPA 검사상 RMP감수성으로 판정된 1명은 임상적으로도 약제내성이 강력하게 의심되었고, 염기서열분석에서도 *rpoB* 유전자 돌연변이가 발견되어 LiPA 검사결과의 오류로 생각되었다. 유전자 검사와 약제 감수성 검사상 동일한 결과

를 보인 28예 중 1예는 임상적으로는 약제내성이 의심되었지만, 약제감수성검사와 LiPA 방법상 RMP 감수성으로 1차 약을 사용하였다. 그러나 1차 약제 치료에 호전이 없어서 결국 2차 약제를 사용후 호전되었다. 종합하면 LiPA법을 이용한 RMP내성진단법은 기존의 약제감수성검사와의 일치율이 87% (28/33)이었고, *rpoB* 유전자의 염기서열을 참고하면 94% (31/33)에서 RMP 약제감수성여부를 올바르게 진단하였다. *rpoB* 유전자 검사결과 확인 후 30예는 약제 변경을 하지 않았고, 3예만 약제변경을 하였다. 3예 모두 임상적으로는 내성이 의심되었지만 1차 약제를 사용하다 LiPA 결과에서 내성으로 판명된 후 2차 약제로 변경하였다. 3예 모두 후에 약제감수성검사상 RMP내성인 다제내성결핵균으로 확인되었다.

약제변경을 하지 않은 30예 중 13예는 이미 LiPA 검사 전에 약제내성을 의심하여 RMP를 제외하고 2차 약제와 병합하여 치료 중이었으며, LiPA검사결과상 RMP내성으로 판정되어 그대로 약제를 사용하였다. 12예는 RMP를 포함하여 1차 약제 치료 중이었으며 LiPA검사상 RMP 감수성으로 판정되어 그대로 1차 약제를 사용하였다. 나머지 5예는 2차 약을 사용하다 LiPA검사상 RMP 감수성으로 판정되었으나 이 중에서 2예는 2차 약제 치료 후에 임상적 호전이 있어서 2차 약을 그대로 사용하였고, 나머지 3예는 1차 약제에 부작용이 있어서 그대로 2차 약제를 사용하였다. 종합하면 3명에서 LiPA검사가 신속하게 약제를 변경하는데 도움이 되었으며, 25명에서 약제를 변경하지는 않았지만 기존의 약제치료가 적절함을 신속하게 확인할 수 있어서 총 28명(85%)에서 LiPA검사가 치료방침의 결정에 도움이 된 것으로 분석되었다.

고 찰

본 연구결과 LiPA 검사법을 이용한 RMP내성검사는 직접 임상 검체에서도 RMP내성을 신속하게 진단할 수 있었고, 약제내성이 의심되는 환자에서 신속하

게 RMP내성여부를 확인함으로써 적절한 치료약제의 선택에 도움이 됨을 알 수 있었다.

LiPA 스트립은 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 확인하기 위하여 5개의 wild-type probe (S1-S5)와 흔히 발견되는 4가지 mutant probe (R2, R4a, R4b, R5)로 구성되어 있다. R2는 516코돈의 Asp→Val 돌연변이를 확인할 수 있으며, R4a는 526 His→Try, R4b는 526 His→Asp, 그리고 R5는 531 Ser→Leu 돌연변이를 검출할 수 있다. 위의 혼한 4가지 mutant probe와 다른 돌연변이가 있을 때는 돌연변이가 있는 부위의 wild-type probe 부위의 밴드가 소실되는 것을 확인함으로써 돌연변이가 생겼음을 확인할 수 있다. 지금까지 실험실에서 시행된 여러 연구보고에서 감수성검사 결과와 일치도가 높은 것으로 보고하였으며¹²⁻¹⁴, 실제 임상검체를 대상으로 한 본 연구에서는 이 보다 낮은 85%의 일치율을 보였다. 그러나 *rpoB* 유전자 염기서열 분석결과에 의하면 일치되지 않았던 5예 중 3예는 LiPA결과가 옳았던 것으로 판명되어 전체적으로 91% (30/33)의 정확도를 보여 기존의 실험실의 결과들과 비슷한 결과를 보여 주었다. 실제로 다제내성결핵환자의 치료 중 감수성검사를 반복하여 보면 중간에 간헐적으로 약제감수성으로 결과가 나오는 경우가 있다. 다른 감수성 균의 오염, 약제내성균에 포함되어 있는 일부 감수성균의 선택적 증식, 감수성검사의 오류 등을 원인으로 추측할 수 있으나 확실하지는 않다. LiPA검사에 오류가 있다고 생각되는 2예 중 1예는 염기서열검사상 *rpoB* 유전자 돌연변이가 발견되었음에도 불구하고 LiPA 스트립에서 감수성 밴드 5개가 모두 양성으로 RMP감수성으로 판정되어 이 연구에서 원인을 확인할 수는 없었다. 다른 1예는 LiPA 밴드를 재검토하였을 때 내성밴드가 희미하게 착색된 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 LiPA 검사 판독시 신중을 기해야 할 것으로 생각되며 밴드가 희미한 것은 다시 한 번 검사를 반복하는 것도 도움이 될 것으로 생각된다. 1예는 약제감수성결과와 LiPA 검사결과 모두 감수성으로 판명되었으나 RMP포함한 1차 약제 치료에 실패하였으며 이

에는 염기서열 분석은 시행되지 않았다.

본 연구에서는 LiPA검사 의뢰 후 평균 5-6일 만에 RMP감수성 결과가 보고되었다. 이는 미국 CDC에서 검체 채취 15-30일만에 약제 감수성검사 결과를 통보할 수 있도록 권고한 내용에도 부합하는 결과이다. LiPA 검사 결과는 약제감수성검사에 비하여 약 2달 정도 빠르게 RMP감수성 결과가 보고되었다. 후향적 검사이므로 대부분 LiPA검사와 약제감수성검사가 동시에 시행되지 않았음을 고려하면 단순히 결과보고시점의 차이를 비교하는 것이 무리일 수 있겠으나, 약제감수성검사는 대부분 치료 시작시에 채취한 검체에서 균이 배양되는 즉시 처방하였고(간접법), LiPA검사는 임상결과 중 내성이 의심되는 시기에 처방하였기때문에 본 연구에서 설정된 상황이 실제 임상 의사가 접하는 상황이므로 임상적 의미가 더 크다고 생각된다. 본 연구의 환자들 중 치료초기에 내성이 의심되어서 약물 치료 시작과 함께 LiPA검사가 시행된 8예의 경우는 평균 73.3일 더 빨리 진단할 수 있었다. 물론 도말검사 양성인 경우에 직접법으로 약제감수성검사를 시행한다면 감수성결과를 더 빠르게 확인할 수 있었을 것이다. 일반적으로 액체배지를 이용하더라도 결핵균 성장과 동정에 약 2주가 소요되고, 이후 감수성검사에 다시 5-7일이 필요하므로 이 보다 훨씬 빠르게 약제감수성 여부를 확인함을 확인할 수 있었다. 그리고 본 연구에서 다른 논문과 차이점은 33명 중 13명은 검체가 균주가 아닌 객담으로 직접 검사함으로써 더 빨리 진단을 할 수 있었다는 점이다.

치료 약 선택에 도움을 준 경우가 28예(85%) 있었다. 실제 약제 변경은 3예만 이루어졌지만, 25예는 약제감수성결과가 나오기전까지 임상적으로 선택한 약물이 적절한 선택임을 확신하고 치료할 수 있었다. 도움이 되지 않은 것으로 판단한 5예 중 3예는 약제 부작용으로 인해서 약제 변경이 불가능한 경우였으므로 대부분의 경우 도움이 되었다고 판단이 된다. 특히 기존에는 약제감수성 결과가 임상적 판단과 다르게 나올 경우 다시 약제감수성결과를 반복하는 방법외에는 없었지만 이런 경우에도 *rpoB* 유전자 검사를 시행하

여 도움을 받을 수 있었다.

그러나 아직 LiPA 검사법이 고가이고 임상 의에게 익숙하지 않아서 임상적으로 내성여부가 의심되는 환자에서 조기에 시행하지 못하였다. 그리고 본 연구의 경우 모두 균이 동정되거나 도말 양성인 경우 *rpoB* 유전자 검사 결과이다. 임상에서 종종 접하게 되는 결핵균에 대한 도말 및 배양음성환자에서의 효용성에 대한 자료는 불충분하다. 향후 이 분야에서도 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 국내에서 아직도 약제감수성검사시 고형배지를 사용하여 감수성 확인에 2-4개월이 소요되는 현실을 감안하면 LiPA를 이용한 RMP내성검사법은 다수에서 다제약제내성 결핵을 빠르고 정확하게 진단할 수 있었고, 신속한 치료 약물 결정에도 도움을 주었다. 하지만 현재의 시점에서 LiPA 방법이 기존의 도말 및 배양검사를 완전히 대체할 수는 없다고 생각되며, 임상상, 도말 및 배양검사결과와 종합하여 보조적으로 사용하면 도움이 될 것으로 사료되었다.

요 약

배 경:

rpoB 유전자 돌연변이는 rifampicin 내성결핵의 96-98%에서 발견된다. 실험실 검사에서는 *rpoB* 유전자가 다제내성결핵의 지표로서 빠른 진단에 사용될 수 있음이 보고되었으나 임상적 적용에 대해서는 아직 국내 및 외국에도 보고가 없는 실정이다.

연구 방법:

서울중앙병원에서 1998년 6월부터 2000년 7월 까지 LiPA법을 이용하여 *rpoB* 유전자 돌연변이분석이 시행된 33명 환자에서 후향적으로 의무기록을 조사하였다. 환자의 임상상, 약제 감수성, 그리고 LiPA 검사 결과를 비교 분석하였다. 전통적인 약제감수성 결과를 표준으로 하여 LiPA 검사 결과와 비교하였으며 양 검사결과가 불일치하는 경우에 *rpoB* 유전자 염기서열분석을 시행하였다.

연구 결과:

평균 나이는 42 ± 19 세이고, 남녀비는 24 : 9 이었다. *rpoB* 유전자 검사 요청 시간으로부터 결과 보고까지 평균 시간은 5.2 ± 2.6 일 이었다. *rpoB* 유전자 검사 결과는 약제 감수성 결과보다 평균시간은 56 ± 35 일 빠르게 보고되었다. 감수성 결과가 알려진 33명 중 28(85%)명에서는 유전자 검사와 동일한 결과를 보였고, 5명(15%) 반대 결과를 보였다. 반대 결과를 보인 5명에서 염기서열 분석을 하였을 때, 3예에서 약물 감수성 결과가 오류였을 가능성이 있고, 나머지 2예는 LiPA 검사결과가 오류였을 가능성이 있다. 치료 약 선택에 도움을 준 경우가 28예(85%) 있었다.

결 론:

LiPA 방법을 이용한 *rpoB* 유전자 검사는 임상에서도 다수에서 다제내성을 신속하고 정확하게 진단할 수 있었고, 치료약 선택에 도움을 주었다. 하지만 현재의 시점에서 LiPA 방법이 기존의 도말 및 배양검사를 완전히 대체할 수는 없고 임상상, 도말 및 배양검사결과와 종합하여 보조적으로 사용하면 도움이 될 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부. 대한결핵협회. 제7차 전국결핵실태조사 결과, 1995.
2. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647-50.
3. 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;32:1095-98.

4. 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;1127:639-43.
5. Beenhouwer HD, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinx L, Rossau R, *et al.* Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuberc Lung Dis* 1995;76:425-30.
6. 이민기, 김윤성, 이효진, 전두수, 윤상명, 박삼석 등. 염기서열결정과 Line Probe분석법에 의한 Rifampin내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 분석. 결핵 및 호흡기질환. 1997;44(2):251-63.
7. 이미경, 박애자, 전희선 : Line ProbeAssay를 이용한 rifampin내성 결핵균의 조기검출. 대한임상병리학회지. 1997;17(2):269-78.
8. 박영길, 조상현, 심명섭, 배길한, 김상재, 송철용 : Line Probe Assay를 이용한 결핵균의 rifampin내성 검사. 대한미생물학회지. 1996;31(1):7-11.
9. 심태선, 유철규, 한성구, 심영수, 김영환. 결핵균의 *rpoB* 유전자 PCR-SSCP법에 의한 Rifampicin내성의 신속 진단. 결핵 및 호흡기질환. 1996;43(6):842-51.
10. 박승규, 정황규. Cold-SSCP법에 의한 내성 결핵균 *rpoB* 유전자의 다형성 분석. 1996;36(2):199-214.
11. 서진태, 김문희, 최종원, 이희주, 강홍모. *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin내성과 관련된 *rpoB* 유전자 염기서열분석. 대한임상병리학회지. 1996;16(1):78-90.
12. Martilla HJ, Soini H, Vyshnevskiy BL, Otten TF, Vasilyef AV, Huovinen P, *et al.* Rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by sequencing and line probe assay. *Scand J Infect Dis* 1998;30(2):129-32.
13. Hirano K, Abe C, Takahashi M. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol* 1999;37(8):2663-6.
14. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniewski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998;36(7):1969-73.