

□ 원 저 □

다제내성 결핵균에서 Rifabutin감수성과 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상의 비교 연구

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실, 아산생명과학연구소¹, (주)바이오메드랩 연구소²

심태선, 김진섭¹, 박미선², 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김동순, 김원동

= Abstract =

Rifabutin Susceptibility and *rpoB* Gene Mutations in Multi-drug Resistant *Mycobacterium Tuberculosis*

Tae Sun Shim, M.D., Jin Sub Kim, BSc¹, Misun Park, Ph.D.²,
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 Institute of Life Science¹, Biomedlab Institute, Biomedlab Co.²,
University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background : Following several decades of decline, the incidence of tuberculosis has recently begun to increase in many countries and the control of this disease has been impeded by the emergence of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). The development of rapid diagnostic methods and effective new drugs are needed to control MDR-TB. One of the new drugs for MDR-TB is rifabutin (RBU) which has been known to be effective in some patients with MDR-TB. A few reports showed that some types of mutations of the *rpoB* gene, which were known to be present in 96-98% of rifampicin-resistant *M. tuberculosis*, were associated with the rifampicin-resistant but RBU-susceptible phenotype. This study was performed to investigate the correlation between RBU susceptibility and the patterns of *rpoB* gene mutations in Korean MDR-TB.

Methods : Sixty-five clinical isolates of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, gathered from patients who visited the Asan Medical Center from July 1997 to June 1999, were investigated. Clinical responses

[†]이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

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

to rifabutin-containing regimen were evaluated. An RBU susceptibility test and sequencing analysis of *rpoB* gene were performed, and the results were analyzed to confirm which mutations correlated with RBU-susceptible MDR-TB.

Results : Fifty-three of 56 (95%) clinical isolates of MDR-TB had 60 mutations of the *rpoB* gene. The most frequent mutations were found at codon 531 (43%), and two mutations were combined in seven clinical isolates. Five of 53 (10%) clinical isolates showed the RBU-susceptible phenotype, and in them the characteristic patterns of point mutations were found at codon 509, 516, and 526.

Conclusion : The frequency and pattern of mutations of the *rpoB* gene of Korean MDR-TB isolates were similar to those in western countries, where the prevalence of tuberculosis is low, but some show RBU-susceptible phenotypes. RBU-susceptible MDR-TB isolates showed the characteristic pattern of mutations of the *rpoB* gene which could be used to rapidly diagnose RBU susceptibility. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 853-869)

Key words : Rifabutin, *rpoB* gene, Mycobacterium tuberculosis, Multi-drug resistant tuberculosis.

서론

결핵은 현재 전 세계적으로 어느 감염성질환보다도 높은 사망의 원인이 되는 질병이다. 현재 세계인구의 1/3이 감염되어 있으며¹, 매년 700-800만명에서 결핵이 발병하고, 약 200-300만명이 결핵으로 사망한다. 국내의 경우 단순 흉부방사선 소견상 활동성 폐결핵의 유병율은 5.1%(1965년)에서 1.0%(1995년)로 꾸준히 감소하고 있지만, 아직도 전국에는 약 40만명 이상의 결핵환자가 있을 것으로 추정되고 있다(1995년)². 최근 세계적으로는 후천성면역결핍증후군(AIDS)의 증가와 함께 다제내성 결핵의 증가가 항결핵치료에 중요한 문제점으로 제기되고 있다. 아직 human immunodeficiency virus(HIV)감염율은 낮지만 국내에서는 이와 무관하게 높은 항결핵 약제내성을 보이고 있으며, AIDS 환자가 점점 증가추세에 있으므로 결핵의 유병률 및 내성율이 현재보다 증가할 가능성은 충분하다고 하겠다.

다제내성 결핵은 치료에 잘 반응하지 않으므로 약제를 복용함에도 불구하고 계속 결핵균을 배출하여 내성 결핵균의 전염원이 되어 초회내성결핵을 전파시킬 가능성이 높다. 따라서 다제내성 결핵의 신속한 발견 및 치료가 필수적임에도 불구하고 사용가능한 항결핵약

제의 종류가 제한되어 있는 한계점이 있다. 따라서 임상에서는 아직 그 효과가 뚜렷이 검증되지 않은 새로운 약제들, 즉 macrolide 계통 항생제(clarithromycin, roxithromycin), clofazimin, augmentin 등을 병합하여 사용하고 있다.

Rifabutin(RBU)은 rifamycin 계통의 spiro-pipedryl유도체로서, 비결핵항산균증, 특히 *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI) 감염과 AIDS 환자의 MAI예방에 사용되고 있다. In vitro에서는 결핵균, MAI, 나균등에서 rifampicin (RFP)보다 더 효과가 우수한 것으로 알려져 있으며³⁻⁵. 다른 여러 비결핵항산균에도 효과가 있음이 알려져 있고⁶, 일부 다제내성 결핵에도 효과가 있음이 보고되었다⁷⁻¹³. RFP내성 결핵균을 대상으로 한 체외실험에서 RBU은 RNA 혹은 단백질형성에 영향을 미치지 않고, thymidine이 DNA에 중합되는 것을 억제하는 것으로 밝혀져서 RFP과는 다른 기전으로 작용할 가능성이 제시되었다¹⁴. 그러나 RBU은 고가이고, 약제감수성검사가 시행되고 있지 않으므로 효과가 있을 환자를 선별하여 사용할 수 없으며, 감수성검사가 시행되더라도 결과를 확인하는데 장기간이 소요되므로 아직 다제내성 결핵환자에서 보편적으로 사용되고 있지 못하다.

최근 분자생물학의 발전으로 결핵균의 약제내성에

관여하는 많은 유전자가 밝혀졌다¹⁵⁻²⁵. 특히 *rpoB* 유전자의 돌연변이는 제한된 81 bp부위에서 발생하고, RFP내성 결핵균의 약 96-98%에서 발견되므로²⁶ 임상에서 많이 사용되고 있다^{19, 27, 28}. 소수 연구에서는 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상에 따라서 RBU감수성에 차이가 있다는 보고가 있었으나²⁹⁻³¹, 아직 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상으로 RBU감수성 여부를 진단하거나 치료효과와 비교한 보고는 없었다. 따라서 국내 환자에서 채취한 임상검체를 대상으로 RBU 감수성검사 및 *rpoB* 유전자 염기서열을 확인하여 RBU 감수성 다제내성 결핵과 관련된 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1997년 7월에서 1999년 6월 사이에 서울중앙병원에 내원한 환자에서 채취된 객담 검체에서 배양된 결핵균 중에서 결핵연구원에 감수성검사를 의뢰하여, 적어도 INH와 RFP에 내성으로 판명된 다제내성 결핵균주들을 대상으로 하였다. 상기 결핵균이 채취된 환자중에서 RBU 감수성검사와 *rpoB* 유전자 염기서열결정법이 시행되고, RBU이 포함된 약제를 1달 이상 사용한 환자들의 의무기록을 후향적으로 조사하여 RBU 포함 약제에 대한 임상적 및 세균학적 반응과 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상을 비교하였다. RBU는 매일 300 mg을 경구 복용하였다. RBU사용 후 1달 이상의 간격으로 시행한 배양검사서 2회 이상 음성으로 나온 경우를 음전(negative conversion)된 것으로 정의하였다.

2. 검체채취 및 결핵균 배양

객담을 받아서 동량의 NALC (N-acetyl-L-cysteine)-NaOH를 넣고 50 ml conical tube (Falcon, NJ, USA)에 옮겨서 충분히 혼합한 후 실온에 15분간 두었다. 멸균증류수를 끝부분까지 넣고 섞은 후 3,

000 rpm (RT 6000B ; Sovall, CT, USA)에서 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고 남아있는 침사액 0.5 ml를 Ogawa 배지에 접종하였다. 접종 전에 Ogawa 배지에 용결수가 있으면 배지사면에 아래로 향하게 하여 시험관 사면을 따라 흘러 버리고, 접종할 때 전처리한 검체 100 μ l를 취하여 배지사면에 분주하여 흐르게 하고 좌우로 흔들어 골고루 접종되도록 하였다. 접종된 배지는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 조건에서 최소한 8주 동안 배양하였다. 균주가 성장하면 밝은 조명하에서 45도 정도의 사광선을 이용하여 집락의 발생, 성장속도, 형태, 색, 질감을 관찰하였고, Accuprobe검사(Gen-Probe, San Diego, USA)를 시행하여 결핵균을 동정하였다.

3. 약제감수성검사

약제감수성검사는 L-J배지를 이용하여 Carnetti등이 제시한 내성비율법(proportion method)에 따라 실시하였다³². 균주부유액을 10^{-3} 과 10^{-5} 배로 희석하여 RFP은 4, 8, 16, 32 및 64 $\mu\text{g/ml}$, RBU은 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 약제가 포함되지 않은 L-J배지를 대조군으로 하여 검사를 시행하였다. 본 연구에서 사용한 L-J 고형배지에서 RBU 감수성검사 시 판정기준농도가 잘 알려져 있지 않으므로 RFP 내성 상태와 비교하여, RFP 배지에서 억제되는 농도의 1/4이하의 농도에서 억제되는 경우를 잠정적으로 RBU감수성으로 판정하였다. Williams등³⁰은 7H9 액체배지를 이용한 감수성검사에서 RFP은 MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 RBU은 1/2 낮은 농도인 1 $\mu\text{g/ml}$ 이하를 감수성으로 판정하였다. 감수성검사에 사용된 RBU는 Pharmacia & Upjohn (Michigan, USA)에서 제공받아 사용하였다.

4. *rpoB* 유전자 염기서열 결정

1) 결핵균 DNA의 추출

Hurley등이 사용한 방법을 약간 수정하여 DNA를 추출하였다³³. 즉, 1.5 ml microcentrifuge tube에

결핵균 검체 200 μ l를 넣은 후, 0.1 mm zirconium bead 200 μ l, TEN (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0)용액 100 μ l, phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)용액 200 μ l를 혼합한 후 mini-bead beater에서 3분간 처리하여 세포를 파괴함과 동시에 단백질을 변형시켰다. 검체를 3,000 rpm (RT 6000B; Sovall, CT, USA)으로 5분간 원심분리한 후, 상층액 200 μ l를 다른 microcentrifuge tube에 옮기고 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)용액 200 μ l를 넣고 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 다른 microcentrifuge tube에 옮겼다. 상층액 100 μ l를 취하여 3 M sodium acetate 10 μ l와 100% 냉동 에탄올 220 μ l를 넣고, -70℃ 냉동고에 15분 방치한 후 10,000 rpm (VS-15000 CF; VISION SCIENTIFIC, Seoul, Korea)에서 10분간 원심분리한 다음, 상층액을 진공흡인으로 제거하고, 공기중에서 완전히 건조시켰다. 추출된 DNA는 멸균 3차 증류수 100 μ l에 용해시켜서 사용 전 까지 -20℃에 보관하였다.

2) 중합효소연쇄반응

먼저 IS6110분절에 대한 PCR(중합효소연쇄반응)을 시행하였다. IS6110-S와 IS6110-AS의 시발체(primer)를 이용하였으며, 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 95℃에서 30초, 68℃에서 30초, 72℃에서 45초씩 35주기를 시행한 다음, 72℃에서 5분간 반응시킨 후 종료하여 123 bp의 증폭물을 생산하였다. IS6110분절에 대한 PCR검사상 양성으로 판명된 검체만을 대상으로 *rpoB* 유전자 염기서열결정법을 시행하였다. *rpo105*와 *rpo293* 시발체를 이용하여 PCR을 시행하여 215 bp 분절을 증폭하였다. 10 pmole/ μ l의 시발체 *rpo105*, *rpo293*를 각각 1 μ l씩 넣고 DNA 1 μ l를 넣은 후 17 μ l의 증류수를 넣어서 최종 20 μ l가 되게 하였다. 반응 조건은 95℃에서 5분간 반응시킨 후, 72℃에서 1분, 95℃에서 30초씩 35주기를 시행한 다음, 72℃에서 5분간 반응시킨 후 종료하였다. GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, California, USA)을 사용하였으며, 반응

액은 20 μ l용 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) PCR산물 정제

215 bp PCR 산물을 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 정제하였다. 2% agarose gel에서 50V로 PCR 산물을 전기영동한 후 215 bp 부위의 밴드를 잘라서 polypropylene tube에 옮겨 담았다. Gel 100 μ l당 3배 부피가 되는 solubilization buffer (QIAGEN, Germany)를 넣고 2-3분마다 잘 섞어주면서 50℃에서 10분간 반응시켰다. Gel이 녹은 후 이와 동량의 isopropanol을 넣고 잘 흔들었다. 이후 column에 검체를 넣고 10,000 rpm (VS-15000 CF; VISION SCIENTIFIC, Seoul, Korea)에서 1분간 원심분리하였다. Wash buffer (QIAGEN, Germany) 0.75 ml를 column에 넣고 1분간 원심분리하였다. Column 아래의 tube에 떨어진 wash buffer 용액을 버리고 다시 1분간 원심분리해서 남은 alcohol을 제거하였다. Column을 새 polypropylene tube에 꽂고 증류수 8 μ l를 넣고, 1분 후에 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 DNA를 추출하였다.

4) 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/ul와 *rpo105* 시발체 5 pmole, terminator ready reaction kit (Perkin-Elmer, California, USA), 50% DMSO, 그리고 증류수를 더하여 총 10 μ l가 되도록 섞었다. 96℃에서 20초 반응시킨 후, 96℃에서 10초, 50℃에서 5초, 60℃에서 4분의 조건으로 25회 실시하였다. 증폭산물은 에탄올을 이용하여 정제하였다. Microcentrifuge tube에 3 M sodium acetate (pH 4.8) 2 μ l와 95% 에탄올 50 μ l을 넣고, 검체 10 μ l와 증류수 10 μ l를 넣었다. 잘 섞은 후에 얼음에 10분간 방치후 14,000 rpm (VS-15000 CF; VISION SCIENTIFIC, Seoul, Korea)에서 4℃에서 30분간 원심분리한 후, 조심스럽게 상층액을 버렸다. 침전물에 70% 에탄올 250 μ l를 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 l를 loading buffer와 섞어 원심시켰다. 90℃에서 2분간 가열후 얼음에 두었다가 6% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다.

5. INNO-LiPA Rif. TB kit을 이용한 *rpoB* 유전자 돌연변이의 검출

RBUS감수성 다제내성 결핵균이 INNO-LiPA Rif. TB kit (Innogenetics, Belgium; 이하 'LiPA'라 약함)검사에서 특정 양상을 나타내는지 확인하고자 RBUS감수성으로 판명된 균주만을 대상으로 LiPA 검사를 시행하였다. LiPA strip은 *rpoB* 유전자의 돌연변이를 확인하기 위하여 5개의 wild-type probe (S1-S5)와 흔히 발견되는 4가지의 mutant probe (R2, R4a, R4b, R5)로 구성되어 있다. R2는 516 코돈의 Asp -> Val 돌연변이를 확인할 수 있으며, R4a는 526 His -> Try, R4b는 526 His -> Asp, 그리고 R5는 531 Ser -> Leu 돌연변이를 검출할 수 있다. 제조회사에서 제시한 방법대로 검사를 시행

하였다.

결 과

1. RBUS 감수성검사 결과

다제내성 65균주 중 52균주에서 RBUS감수성 결과를 확인할 수 있었다. 11균주는 잡균에 의한 오염으로 검사가 불가능했고, 2균주는 반복검사에서 RFP감수성으로 판정되어 연구에서 제외되었다. 52균주중 5균주(10%)에서 RFP내성, RBUS감수성으로 판명되었다.

2. *rpoB* 유전자 돌연변이 양상

다제내성 65균주중 56균주에서 *rpoB* 유전자 염기서열이 확인되었다. 56균주중 53균주(95%)에서 *rpoB* 유전자 돌연변이가 발견되었다. 모두 60개의 돌연변이가 발견되었으며, 531 코돈의 돌연변이가 26개(43%)로 가장 많았고, 이 중 531 TCG -> TTG 돌연변이가 23예(38%)로 가장 빈도가 높았다. 7예에서는 돌연변이가 2개씩 존재하였다. 돌연변이의 종류는 모두 23가지이며, 점 돌연변이 21예, 결실 1예, 그리고 삽입 1예이었다(Table 1).

3. *rpoB* 유전자 돌연변이 양상과 RBUS 감수성의 비교

다제내성 65균주중 44균주에서 *rpoB* 유전자 염기서열분석과 RBUS 감수성검사가 동시에 시행되었고, 이 44균주를 대상으로 분석하였다. 44균주 중에서 5균주(11%)가 RBUS감수성으로 판명되었고, 관련된 *rpoB* 유전자 돌연변이는 다음과 같았다(Table 2). 5예중 2예에서는 526코돈의 돌연변이가 관찰되었고, 1예는 516코돈의 돌연변이, 1예는 509코돈과 526코돈의 돌연변이, 그리고 나머지 1예는 516코돈과 526코돈의 돌연변이가 동시에 관찰되었다. 가장 많은 빈도로 관찰된 531코돈의 돌연변이는 모두 RBUS내성

Table 1. Genetic alterations in the *rpoB* gene of 56 clinical isolates of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Position(codon)	Wild-type	Mutations	No.	Total No.(%)
531	TCG(Ser)			26 (43)
		TTG (Leu)	23	
		TGG (Trp)	3	
526	CAC(His)			16 (27)
		TAC (Try)	4	
		AAC (Asn)	3	
		CGC (Arg)	3	
		CTC (Leu)	2	
		CCC (Pro)	1	
		CAA (Gln)	1	
		GCC (Ala)	1	
		TGC (Cys)	1	
516	GAC(Asp)			6 (10)
		GTC (Val)	2	
		TAC (Try)	3	
		GAG (Glu)	1	
509	AGC(Ser)	AGA (Arg)	1	1 (1.7)
513	CAA(Gln)	CCA (Pro)	3	3 (5)
524	TTG(Leu)	TTA (Leu)	2	2 (3.3)
510	CAG(Gln)	CAA (Gln)	1	1 (1.7)
511	CTG(Leu)	CCG (Pro)	1	1 (1.7)
527	AAG(Cys)	ATG (Met)	1	1 (1.7)
533	CTG(Leu)	CCG (Pro)	1	1 (1.7)
		516-521 codon deletion	1	1 (1.7)
		CAA insertion(514 codon)	1	1 (1.7)
Total			60	60 (100)

을 나타내었다.

4. LiPA 검사를 이용한 *rpoB* 유전자 돌연변이의 검출

RBu에 감수성을 보인 5균주의 DNA를 대상으로 LiPA 검사를 이용하여 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상

을 확인하였다 (Fig. 1). 5균주중 1균주는 R4b 밴드 양성(526 GAC)으로 나와서 특정 돌연변이를 확인할 수 있었으나, 다른 4균주는 감수성 밴드중 일부가 소실되어서 돌연변이가 의심되는 소견이었지만 특정 돌연변이를 확인할 수는 없었다(Table 3). R4b 밴드 양성으로 나온 균주는 염기서열결정법에서는 526 CAC → GCC 돌연변이가 관찰되었으나, LiPA 검

Table 2. Relationships between susceptibility to rifampicin and rifabutin and genetic alterations in the *rpoB* gene in 44 clinical isolates of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Position(codon)	Wild type	Mutations	Susceptibility		No. (n)
			RFP	RBV	
533	CTG	CCG	R	R	1
531	TCG	TTG	R	R	19
		TGG	R	R	3
526	CAC	TAC	R	R	3
		AAC	R	S*	1
		AAC	R	R	1
		CCC	R	R	1
		CGC	R	R	1
		TGC	R	S*	1
516	GAC	TAC	R	S*	1
		GTC	R	R	1
513	CAA	CCA	R	R	2
Combined	509 AGC→AGA,	526 CAC→GCC	R	S*	1
	511 CTG→CCG,	516 GAC→TAC	R	R	1
	516 GAC→GAG,	526 CAC→AAC	R	S*	1
	524 TTG→TTA,	531 TCG→TTG	R	R	2
	526 CAC→CAA,	18 bp deletion	R	R	1
	527 AAG→ATG,	531 TCG→TTG	R	R	1
No mutations			R	R	2

R : Resistant, *S : Susceptible.

사에서는 RBV내성과 관련된 것으로 보고된 GAC 돌연변이가 관찰되었다.

5. RBV 포함 약제로 치료한 환자의 임상상

RBV 감수성검사와 *rpoB* 유전자 염기서열이 동시에 확인된 44명중 7명에서 RBV가 포함된 약제로 1개월 이상 치료하였다. 6명에서 RBV내성이었고 1명에서 RBV감수성이었다. *rpoB* 유전자 돌연변이는 다음과 같았다(Table 4). RBV감수성 환자는 RBV포함한 약제 치료에도 불구하고 균음전에 실패하였다.

고 찰

본 연구의 목적은 국내에서 채취된 다제내성 결핵균에서 RBV감수성 균주의 빈도를 파악하고, *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상을 파악하며, 이 돌연변이 중에서 RBV감수성과 연관있는 돌연변이를 검출하여 RBV 감수성 다제내성 결핵을 신속하게 진단할 수 있는 진단법을 개발하기 위한 기초자료를 모으고자 함이었다. 이 연구결과 *rpoB* 유전자 돌연변이 빈도 및 양상은 외국에서 보고한 자료와 거의 일치하는 것을 확인할 수 있었고, 약 10%의 다제내성 결핵균이 RBV감

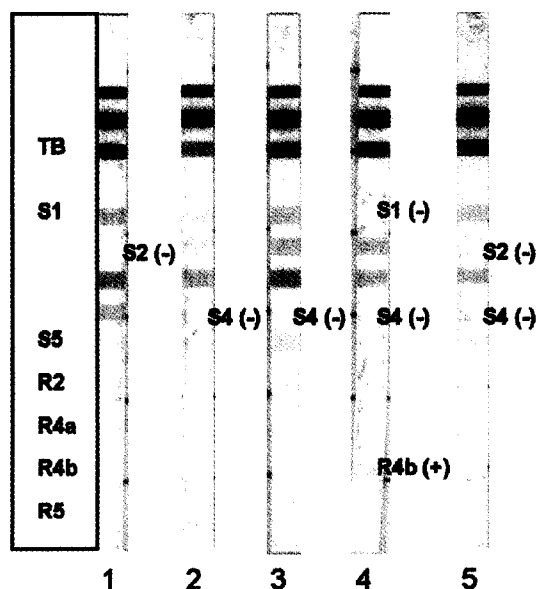


Fig. 1. The results of LiPA assay in the patients with rifabutin-susceptible multi-drug resistant tuberculosis. Clinical isolate No. 4 shows R4b mutation, namely codon 526 CAC → GAC, although it showed codon 526 CAC → GCC mutation in sequencing analysis. But mutation analysis using DNA chip found both mutations in clinical isolate No. 4 (Fig. 2C), so these data suggest that clinical isolate No. 4 may be a mixed growth of *Mycobacterium tuberculosis* with different mutations of the *rpoB* gene.

수성임을 알 수 있었다. 또한 이 돌연변이 양상에 기초하여 RBU감수성 다제내성 결핵을 신속하게 진단할 수 있는 기초자료를 마련하였다.

약제내성의 빠른 진단 및 적절한 치료는 결핵의 조절에 필수적인 요소임에도 불구하고 국내에서는 결핵균의 배양 및 약제감수성검사시 대부분 고형배지를 이용하므로 약제감수성의 진단에 약 2-3개월이 소요되게 된다³⁴. 따라서 국외 및 국내의 일부 병원에서는 *rpoB* 유전자의 돌연변이 검출을 이용한 신속한 내성 진단법을 임상에서 사용하고 있다^{35,36} 한편 다제내성에 대한 새로운 치료제로서 RBU이 일부 다제내성에

효과가 있음이 알려진 후, 임상에서 사용되고 있으나 가격과 제한된 효과 때문에 사용이 제한되어 있다.

Ohno등³⁷은 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상에 따라 다양한 RFP내성 양상을 나타낸다고 보고하였고, 특정 *rpoB* 유전자 돌연변이들은 RFP내성이면서 RBU감수성을 보이는 결핵균주와 관련이 있다고 보고하였다²⁹⁻³¹. 본 연구에서도 526 코돈에서 CAC (His) → GCC (Ala), TGC (Cys), 또는 AAC (Asn) 점돌연변이, 그리고 516 코돈에서 GAC (Asp) → TAC (Try) 또는 GAG (Glu) 돌연변이, 그리고 509코돈의 AGC → AGA돌연변이가 RBU감수성 다제내성 결핵균에서 발견되었다. Bodmer등의 연구에서는 511, 516, 522 코돈의 돌연변이가 RBU감수성 다제내성 결핵과 관련이 있음을 보여주었으나, 526 코돈의 돌연변이가 있는 균주는 모두 RBU에도 내성이었다²⁹. Williams등도 526 코돈의 돌연변이가 있는 균주는 모두 RBU내성임을 보고하였다³⁰. 그러나 본 연구에서 발견된 6종류의 526 코돈 돌연변이중 4종류는 RBU내성을 나타내었고, 나머지 두 종류는 감수성을 나타내었다(Table 2). 이 두 종류의 돌연변이는 기존의 Bodmer 또는 Williams등의 보고에서는 밝혀지지 않았던 돌연변이였다. Yang등의 보고에서도 본 연구결과와 같이 526 코돈의 돌연변이 양상에 따라 RBU감수성이 변환을 보여주었다³¹. 이 외에도 RBU감수성 다제내성 결핵과 관련이 있는 *rpoB* 유전자의 돌연변이로는 519 코돈의 AAC (Asn) → Lys, 529코돈의 CGA (Arg) → AAA (Lys), 514코돈에 TTC (Phe) 삽입, 518코돈에 AAC (Asn) 결실등이 보고되어 있다^{18,31}.

본 연구에서 526코돈의 CAC (His) → AAC (Asn) 돌연변이가 2 균주에서는 단독으로 발견되었고, 1 균주에서는 516코돈의 돌연변이(GAG)와 병합하여 발생하였다. 그러나 이 중에서 526코돈 단독으로 발생했던 1 균주에서는 RBU내성으로 판명되었고, 다른 2 균주는 RBU감수성으로 판명되어 모순된 결과를 보여주었다. 또한 516코돈의 GAC (Asp)

Table 3. The results of LiPA assay in patients with rifabutin-susceptible multi-drug resistant tuberculosis

Patient No.	Mutations	INNO-LiPA Rif. TB kit	
		S-band	R-band
1.	516 GAC -> TAC	S2 (-)	all (-)
2.	526 CAC -> TGC	S4 (-)	all (-)
3.	526 CAC -> AAC	S4 (-)	all (-)
4.	509 AGC -> AGA, 526 CAC -> GCC	S1 (-), S4 (-)	R4b (+)*
5.	516 GAC -> GAG, 526 CAC -> AAC	S2 (-), S4 (-)	all (-)

*R4b : codon 526 CAC (His) -> GAC (Asp) mutation. Patient No. 4 showed 526 CAC->GCC mutation in sequencing analysis, CAC -> GAC mutation in LiPA assay, and both mutations in DNA chip analysis.

Table 4. The rifabutin susceptibility, *rpoB* gene mutations, and clinical response to rifabutin-containing regimen

Patient No.	Age	Sex	Sensitive drugs ^a	Duration (Mo) ^b	Clinical response ^c	Mutations	RBU susceptibility ^d
1.	51	M	5	12	Failure, Death	531 TCG->TTG	R
2.	49	M	2	3	Failure	524 TTG->TTA, 531 TCG->TTG	R
3.	53	M	3	12	Success	531 TCG->TTG	R
4.	52	M	7	3	Failure	531 TCG->TTG	R
5.	71	M	4	9	Failure	526 CAC->AAC	R
Transient(-)conversion							
6.	78	M	7	6	Failure	526 CAC->TAC	R
7.	38	F	9	10	Failure	526 CAC->TGC	S

a : The number of susceptible drugs according to the results of susceptibility test performed in Korean Tuberculosis Institute.

b : Duration of rifabutin therapy.

c : Clinical response to rifabutin-containing regimen.

d : R: resistant, S: susceptible.

-> GTC (Val) 돌연변이가 있는 균주는 RBU내성으로 판명되어서, RBU감수성이라고 보고한 다른 연구들의 결과와 일치하지 않았다²⁹⁻³¹. 그러나 Moghazeh등의 보고에도 526 코돈의 같은 CAC (His) -> CTC (Leu) 돌연변이에도 불구하고 한 균주는 RBU감수성, 다른 균주는 RBU내성을 나타내어서 RBU내성에 *rpoB* 유전자 외에 다른 기전이 작용할 가능성을 보여주고 있다³⁸. 잘 알려진 것처럼

RFP내성결핵균의 2-4%에서는 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 발견되지 않으므로 다른 내성기전이 있을 것임을 시사하고 있다. 518 코돈의 AAC (Asn)결실도 보고마다 다양한 RBU감수성 결과를 보여주고 있다. 따라서 본 연구에서 RBU내성으로 판명된 516 코돈의 Asp -> Val 돌연변이와 526코돈의 His -> Asn돌연변이는 아마도 다른 RBU내성기전이 병합되었을 가능성을 배제할 수는 없다. RFP 내성의

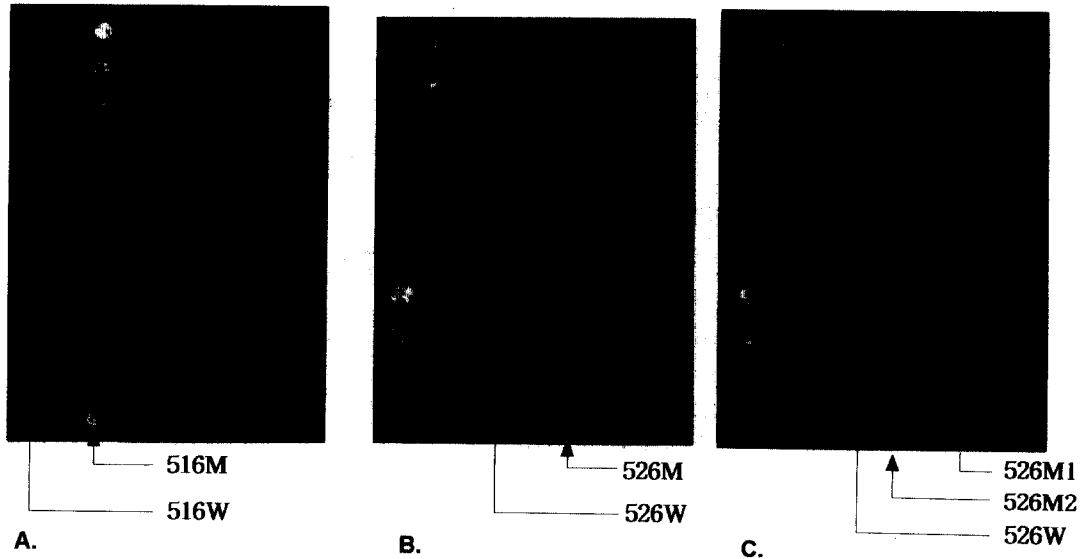


Fig. 2. The preliminary results of DNA chip analysis for the detection of *rpoB* gene mutations associated with rifabutin-sensitive *M. tuberculosis*. All are duplicated. A. 516M spot (mutant, 516 GAG) showed more dense fluorescence than that of 516W(wild type, 516 GAC), meaning that this organism had mutation in the 516 codon of *rpoB* gene (GAC -> GAG). B. 526M spot (mutant, 526 TGC) showed more dense fluorescence than that of 526W (wild type, 526 CAC), meaning that this organism had mutation in the 526 codon of the *rpoB* gene (CAC -> TGC). C. 526M1 (mutant, GAC) and 526M2 (mutant, GCC) spots showed more dense fluorescences than that of 526W (wild type, 526 CAC), meaning combined mutations of 526 CAC -> GAC and GCC.

다른 기전에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

한 균주에서는 511코돈의 CTG (Leu) -> CCG (Pro)와 516코돈의 GAC (Asp) -> TAC (Try) 돌연변이가 같이 병합되어 있었는데, 각각의 돌연변이는 RBU감수성을 나타내는 돌연변이임에도 불구하고 이 균주에서는 RBU내성을 나타내었다. Williams의 보고에서도 516코돈의 Asp -> Val, 522코돈의 Ser -> Leu돌연변이가 병합되어 있는 균주에서 각각의 돌연변이는 MIC가 0.5 μ g/ml이하로 RBU감수성을 나타냄에도 불구하고 병합된 균주에서는 MIC가 2 μ g/ml로 내성을 나타내었다. 그러나 Moghazeh 등의 보고에서는 511 CTG (Leu) -> CGG (Arg)와 516코돈의 GAC (Asp) -> TAC (Try) 돌연변이가 병합된 균주에서 rifamycin계통 약제로서 RBU와 유사한 KRM-1648약제에 감수성을 나타내었다³⁸

본 연구에서 511과 516코돈의 돌연변이가 병합된 균주에서 *rpoB* 유전자 돌연변이 이외에 다른 RBU내성기전이 같이 병합되었을 가능성도 고려하여야 하겠지만, 각 돌연변이의 양상에 따라 서로 다르게 상호작용을 할 가능성이 있음을 염두에 두어야 하겠다. 이러한 문제들을 확실하게 해결하기 위해서는 약제감수성 결핵균에 특정 돌연변이가 포함된 유전자를 이입시켜서 감수성의 변화를 확인하는 것이 중요하다. 향후 이에 대한 추가 연구가 필요하리라 생각된다.

509코돈과 526코돈의 돌연변이가 병합된 균주는 RBU감수성을 나타내어서, 509코돈 AGC -> AGA와 526코돈의 CAC -> GCC 돌연변이 각각이 RBU감수성과 관련 있는 돌연변이로 추정할 수 있었다. 그런데 이 균주를 대상으로 한 LiPA 검사에서는 R4b양성, 즉 526코돈 CAC -> GAC 돌연변이

로 판명되었다. 526코돈 GAC는 RBU에도 내성으로 알려진 돌연변이므로 서로 상충되는 결과였다. 그런데 RBU감수성과 연관된 돌연변이를 기초로 한 DNA 칩을 만들어서 검체를 대상으로 연구한 결과(논문투고 예정임), 이 균주에서는 526코돈 돌연변이가 두 가지 존재하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2C). 전통적인 감수성검사도 약제포함배지에서 특정 분율(보통 1%) 이상의 균주가 자라는 경우를 내성으로 하는 것처럼, 같은 환자에서 채취된 검체라도 다양한 균주가 섞여 있을 수 있고, 이 균주들의 분율에 따라서 감수성여부가 결정된다고 볼 수 있겠다. 아마도 이 균주의 경우는 526코돈 GCC 돌연변이를 가지는 균주가 많기 때문에 염기서열결정에서 GCC로 판독되고 RBU 감수성으로 나왔지만, 일부에서는 526코돈 GAC 돌연변이를 갖는 균주가 일부 섞여 있고, LiPA 검사는 526코돈 GCC 돌연변이는 검출할 수 없기 때문에 R4b (526 GAC) 양성으로 나온 것으로 추측할 수 있다. 추측이 맞다면 이런 경우에는 RBU감수성임에도 불구하고 LiPA 검사상 내성으로 판명될 수 있으므로 주의하여야 하겠다. 현재 임상에서 RFP내성을 신속하게 확인하기 위하여 SSCP (single strand conformational polymorphism) 또는 reverse hybridization법을 이용하여 상품화 된 LiPA 검사를 많이 사용하고 있다. SSCP법은 특정부위의 돌연변이 유무만을 확인하므로 상기에서 제시된 RBU감수성 여부를 판별하는데는 도움이 되지 않고, LiPA 검사는 위의 결과에서 보듯이 R2, R4a, R4b, 그리고 R5 band가 양성인 경우를 제외하고는 특정 돌연변이를 확인할 수 없기 때문에 RBU감수성 여부 확인에는 도움이 되지 못한다. 본 연구에서 RBU감수성 5 균주 중 1 균주만이 R4b 양성으로 특정 돌연변이를 확인할 수 있었고, 다른 4 균주에서는 특정 돌연변이는 확인할 수가 없었으므로 RBU감수성 여부를 알 수 없었다. 염기서열결정법을 이용하면 모든 RFP내성 및 RBU감수성여부를 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상에 따라 파악할 수 있겠지만, 아직 현실적으로 일반 검사실마다 모두 사용하기는 어렵다. 최근 DNA 칩 기술이

개발되면서 위의 여러가지 문제를 모두 만족시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다. Troesch 등은 마이코박테리움의 동정 및 RFP내성을 동시에 확인할 수 있는 DNA 칩을 개발하였다³⁰. DNA 칩은 좁은 면적에 많은 probe를 심을 수 있으므로, 약제내성에 관련된 유전자들이 밝혀짐에 따라 관련된 모든 돌연변이를 한 개의 칩으로 검사할 수 있는 가능성을 지니고 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서 밝혀진 RBU 감수성과 관련된 돌연변이 정보를 이용하여 DNA 칩을 제작하면 RFP내성뿐만 아니라 RBU감수성까지도 확인할 수 있는 DNA 칩의 제작이 가능하리라 생각되며, 실제로 이 자료를 기초로 하여 DNA 칩을 개발중에 있다(Fig. 2). 지금까지 다른 연구에서 보고된 결과와 본 연구에서 밝혀진 RBU감수성과 관련된 것으로 알려진 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상을 종합하여 정리하여 보았다(Table 5)²⁹⁻³¹. 향후, 알려진 모든 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상마다 RBU감수성 여부와의 상관성을 확인하고, 이 모든 돌연변이들을 확인할 수 있는 probe를 포함하는 DNA 칩이 제작되어야 하겠다.

그러나 이 연구에는 몇가지 제한점이 있다. 첫째, 특정 돌연변이가 약제내성을 유발하는지를 확인하기 위하여는 약제감수성균에 특정 돌연변이를 포함하는 유전자를 이입시켜서 약제내성으로 형질이 변환됨을 확인하여야 한다. 531코돈의 Ser → Leu 또는 526코돈의 His → Try 돌연변이는 이와 같은 연구를 통하여 RFP뿐만 아니라 RBU에도 내성을 나타냄이 확인되었고, 516코돈의 Asp → Val 돌연변이는 RFP 내성이지만 RBU감수성을 나타냄이 확인되었다³⁰. 대부분의 돌연변이는 여러 연구에서 반복적으로 확인되었으므로 유전자이입을 통한 연구가 필요 없으리라 생각되지만, 526코돈의 His → Leu 돌연변이나 518코돈의 AAC (Asn) 결실처럼 기존의 연구에서 각기 다른 결과를 보여준 경우 또는 드물게 발견되는 돌연변이의 경우에는 유전자 이입 연구로 확인할 필요가 있겠다. 또한 두 가지 이상의 돌연변이가 병합된 경우에도 서로 어떤 영향을 미칠지 모르므로 확인이 필요 하겠다.

Table 5. Summary of correlations between rifabutin-susceptibility and mutations of the *rpoB* gene in multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* *

Susceptibility results	Position (codon)	Sequences	
		Wild-type	Mutant
Rifabutin-susceptible	509	AGC (Ser)	AGA (Arg)
	511	CTG (Leu)	Pro
	515	ATG (Met)	GTG (Val)
	516	GAC (Asp)	GTC (Val)
			TAC (Tyr)
			GAG (Glu)
	519	Asn	Lys
	522	Ser	Leu
	526	CAC (His)	CAG (Gln)
			GGC (Gly)
			Ala
			Cys
	529	CGA (Arg)	AAA (Lys)
Rifabutin-resistant	510	CAG (Gln)	CAT (His)
	513	CAA (Gln)	CTA (Leu)
			AAA (Lys)
			Pro
	515-517		Met-Asp-Gln deletion
	517		Gln deletion
	518-519		Asn deletion
	521	Leu	Met
	526	CAC (His)	TAC (Tyr)
			CCC (Pro)
			Leu
			CGC (Arg)
			GAC (Asp)
	527	Lys	Gln deletion
	531	TCG (Ser)	TTG (Leu)
			TGG (Trp)
			Tyr
			TTT (Phe)
			Pro
Borderline or Debatable	514		TTC (Phe) insertion
	516,518	Asp, Ser	Val, Leu
	518		AAC (Asn) deletion
	526	CAC (His)	AAC (Asn)
	533	CTG (Leu)	CCG (Pro)

*These data were summarized from the results of this article and from the references 29, 30, and 31.

둘째, RBU 감수성검사 결과에서 내성 및 감수성을 판별할 기준이 확립되어 있지 않았다. 약제감수성검사 결과를 판독하기 위해서는 판정기준농도(critical concentration)를 설정하고, MIC를 이 농도와 비교하여야 한다. MIC는 약제가 없는 배지에서 배양하였을 때 보다 99% 이상 발육을 억제하는 최소농도를 말하며, 1% 내성비율법은 약제가 포함되지 않은 배지에 비하여 판정기준농도의 약제가 포함된 배지에서 1% 이상 자라면 내성으로 판정한다. 즉 판정기준농도의 약제를 포함한 배지에서 1% 미만으로 자라면 그 약제에 감수성으로 판정되고 MIC는 그 판정기준농도 이하가 된다. 본 연구에서는 감수성검사시 egg-based 배지인 L-J 고형배지를 이용하였고, INH는 0.2 µg/ml, RFP는 40 µg/ml의 알려진 판정기준농도를 사용하였다. 그러나 RBU의 경우에는 판정기준농도가 잘 알려져 있지 않으며, 각 연구마다 다른 배지를 사용하였고, 기준 MIC도 다양하였다. RFP의 약물동력학을 보면 상용량 복용후 혈중최고농도가 3.5 µg/ml인데 비하여 RBU는 0.46 µg/ml밖에 되지 않는다^{40, 41}. 그러나 RBU는 지질용해도(lipid solubility)가 상당히 높은 것이 특징이고⁴⁰, 조직/혈장 농도 비가 투약 12시간후에는 5.6-6.8배에 도달하므로 혈중농도만으로 MIC를 평가하기는 어렵다⁴². 많은 임상 증례를 대상으로 MIC와 임상적 효과에 관한 자료를 종합하여 적절한 판정기준농도 또는 내성판단 기준이 되는 MIC를 정하여야 하지만, 아직 이에 대한 자세한 연구가 없는 실정이다. 게다가 다른 연구는 주로 액체배지 또는 agar-based 고형배지를 사용하였으므로 이와 비교도 어렵다. 따라서 본 연구에서는 다양한 농도의 RFP와 RBU농도에서 균을 배양하여서 RFP 감수성검사와 비교하여, 균의 성장이 완전히 억제되는 RFP함유 농도의 1/4이하의 낮은 RBU농도에서 균이 배양되지 않는 경우에 RBU감수성 다제내성 결핵균으로 정의하였다. 향후 RBU 감수성검사의 명확한 기준이 제시되면 이를 기초로 하여 다시 고찰해야 할 것으로 생각된다.

셋째, RBU감수성으로 판명된 군주가 채취된 환자

에서 실제로 RBU이 임상적으로 효과가 있었는지에 대한 임상자료가 부족하였다. 감수성검사에서 판정기준농도에 군주가 감수성인지 내성인지는 인체에서 도달되는 실제 약물농도와는 관련이 없고, 단지 검사를 위한 추정농도로서 판정기준농도에서 내성이면 해당 환자는 약물치료에 반응을 하지 않을 것이라고 가정되는 것이다. 그러므로 실제 인체에서의 효과를 증명하기 위해서는 임상적 치료경험이 중요하다. 본 연구에서는 5군주만이 RBU감수성 다제내성 결핵으로 판명되었고, 이 중에서 1예에서만 RBU를 사용하였으므로 그 효과를 판정하기 어려웠다. RBU를 사용한 1예는 526코돈에 CAC (His) → TGC (Cys) 돌연변이가 있었던 환자로, RBU를 다른 약제와 병합하여 9개월간 치료하였으나 균 음전에 실패하였다. 결핵의 치료시 다제병용요법이 원칙이므로, 다른 약제들이 모두 내성인 상태에서 한 가지 감수성인 약제만을 사용해서는 바로 그 약제에 내성이 발생해서 효과가 없어지게 된다. 따라서 현재처럼 모든 약제들을 사용해도 치료에 실패한 환자에서 RBU를 사용하게 되면 RBU감수성 군주임에도 불구하고 바로 RBU내성이 발생할 수 있다. Table 4에서 보듯이 RBU사용 직전 감수성검사에 의한 감수성 약제의 수는 많지만, 상기 약제들 치료실패 후에 RBU를 포함한 약제를 사용하였으므로 임상적으로는 다른 약제들에 거의 내성이었다고 판단된다. 따라서 다제내성 결핵으로 진단되면 바로 RBU감수성 여부를 확인하여 RBU감수성임이 판명되면 RBU를 병합요법에 포함시키는 치료법을 고려하여야 하겠다. 물론 검사상 RBU감수성으로 판명되어도 실제 인체에서는 효과가 없을 수 있으므로, RBU 감수성검사 결과와 인체내에서의 효과와의 상관성에 대한 임상적 연구가 먼저 시행되어야 하겠다.

결론적으로, 국내 다제내성 결핵균에서 *rpoB* 유전자 돌연변이의 빈도 및 양상은 결핵의 유병율이 낮은 국외의 보고와 비슷하였으며, 일부는 RBU에 감수성을 나타내었다. *rpoB* 유전자 돌연변이 양상을 이용하여 RBU감수성 다제내성결핵을 신속히 진단할 수 있을 것으로 사료되었다.

요 약

연구배경 :

최근 세계적으로 결핵의 증가와 함께 다제내성 결핵의 조절이 문제가 되고 있으며, 결핵 및 약제감수성의 신속한 진단과 새로운 약제의 개발이 시급하다. Rifabutin (RBU)은 rifampicin (RFP)과 같은 rifamycin계통의 약제로, 일부 다제내성 결핵에서 효과가 있음이 보고되어 있다. 소수의 국외 연구에서 RFP내성과 관련된 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상에 따라 rifamycin계통 약제의 감수성여부가 결정된다고 보고되었다. 아직도 내성율이 높은 국내 현실에서 다제내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상을 파악하고, RBU감수성을 나타내는 돌연변이 양상을 확인하여 RBU감수성 다제내성 결핵을 신속하게 확인할 수 있는 진단법의 기초자료를 구하고자 하였다.

방 법 :

1997년 7월에서 1999년 6월 사이에 서울중앙병원을 방문한 65명의 다제내성결핵환자에서 얻은 균주를 대상으로 RBU감수성검사와 *rpoB* 유전자 염기서열결정법을 시행하여 그 결과를 비교하였다.

결 과 :

다제내성 결핵균 65균주중 52균주에서 RBU약제감수성검사를 시행하였고, 56균주에서 *rpoB* 유전자 염기서열이 확인되었다. 44균주에서 *rpoB* 유전자 염기서열분석과 RBU약제감수성검사가 동시에 시행되었다. 염기서열이 확인된 56균주중 53균주(95%)에서 *rpoB* 유전자 돌연변이가 발견되었다. 발견된 60개 돌연변이중 531 코돈 돌연변이가 26개(43%)로 가장 많았으며, 7예에서는 돌연변이가 2가지씩 존재하였다. RBU감수성 균주는 10% (5/53)이었다. RBU감수성 균주가 채취된 5명중 1명에서 RBU를 복용하였으나 균음전에는 실패하였다. RBU감수성 다제내성 결핵균과 관련된 *rpoB* 유전자 돌연변이는 526 코돈의 CAC → AAC, GCC, 또는 TGC, 516 코돈의 GAC → TAC 또는 GAG, 그리고 509 코돈의 AGC → AGA 점돌연변이 이었다.

결 론 :

국내 다제내성 결핵균에서 *rpoB* 유전자 돌연변이의 빈도 및 양상은 결핵의 유병율이 낮은 국외의 보고와 비슷하였으며, 일부는 RBU에 감수성을 나타내었다. RBU감수성을 나타내는 *rpoB* 유전자 돌연변이 양상을 이용하여 다제내성 결핵균에서 RBU감수성인 균주를 신속히 진단할 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구에 도움을 주신 결핵연구원 배길한 선생님께 감사의 마음을 드립니다.

참 고 문 헌

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Programme-Global Tuberculosis Control. WHO Report 1997. Geneva:WHO, 1997;WHO/TB97. 225.
2. 보건복지부, 대한결핵협회 : 제7차 전국 결핵실태 조사결과, 1995.
3. Della Bruna C, Schioppacassi G, Ungheri D, Jabes D, Morvillo E, Sanfilippo A. LM 427, a new spiropiperidylrifamycin : in vitro and in vivo studies. J Antibiot 1983;36:1502-6.
4. Heifets LB, Iseman MD, Lindholm-Levy PJ. Determination of MICs of conventional and experimental drugs in liquid medium by the radiometric method against Mycobacterium avium complex. Drugs Exp Clin Res 1987;13:529-38.
5. Dickinson JM, Mitchison DA. In vitro observations on the suitability of new rifamycins for the intermittent chemotherapy of tuberculosis. Tubercle 1987;68:183-93.
6. Kunin CM. Antimicrobial activity of rifabutin. Clin Infect Dis 1996;22:S3-13.
7. De Cian W, Sassella D, Wynne BA. Clinical expe-

- rience with rifabutin in the treatment of mycobacterial infections. Scand J Infect Dis Suppl 1995;98:22-6.
8. Ridzon R, Whitney CG, McKenna MT, Taylor JP, Ashkar SH, Nitta AT, *et al.* Risk factors for rifampin mono-resistant tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1881-4.
9. Pretet S, Lebeaut A, Parrot R, Truffot C, Grosset J, Dinh-Xuan AT. Combined chemotherapy including rifabutin for rifampicin and isoniazid resistant pulmonary tuberculosis. G.E.T.I.M. Eur Respir J 1992;5:680-4.
10. Chen CH, Shih JF, Lindholm-Levy PJ, Heifets LB. Minimal inhibitory concentrations of rifabutin, ciprofloxacin, and ofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* isolated before treatment of patients in Taiwan. Am Rev Respir Dis 1989;140:987-9.
11. Heifets LB, Iseman MD, Cook JL, Lindholm-Levy PJ, Drupa I. Determination of in vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to cephalosporins by radiometric and conventional methods. Antimicrob Agents Chemother 1985; 27:11-5.
12. Gillespie SH, Baskerville AJ, Davidson RN, Felmingham D, Bryceson AD. The serum rifabutin concentrations in a patient successfully treated for multi-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Antimicrob Chemother 1990;25:490-1.
13. Hong Kong Chest Service, British Medical Research Council. A controlled study of rifabutin and an uncontrolled study of ofloxacin in the retreatment of patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid, streptomycin and rifampicin. Tuber Lung Dis 1992;73:59-67.
14. Ungheri D, Della Bruna C, Sanfilippo A. Studies on the mechanism of action of spiropipedyd rifamycin, LM427, on rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Drugs Exp Clin Res 1984a;10:681-9.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Wilson TM, Collins DM. *ahpC*, a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Mol Microbiol 1996;19:1025-34.
19. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, *et al.* Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647-50.
20. Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:414-8.
21. 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 1993;10: 521-7.
22. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, *et al.* Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculo-*

- sis *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:773-80.
23. Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, *et al.* Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:362-6.
24. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 1996;2:662-7.
25. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wiele B, *et al.* The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat Med 1997;3:567-70.
26. Telenti A. Genetics of drug resistance in tuberculosis. Clin Chest Med 1997;18:55-64.
27. 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. Tuber Lung Dis 1995;76:425-30.
28. 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.
29. Bodmer T, Zurcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 1995;35:345-8.
30. 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.
31. 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.
32. Canetti G, Wallace Fox, 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 Wld Hlth Org 1969;41:21-43.
33. Hurley SS, Splitter GA, Welch RA. Rapid lysis technique for mycobacterial species. J Clin Microbiol 1987;25:2227-9.
34. 고윤석. 우리나라 결핵균 검사의 현재와 미래. 임상치의 기대. 대한임상병리학회지 1997;17:S26-31.
35. Drobniewski FA. Diagnosing multidrug resistant tuberculosis in Britain. Clinical suspicion should drive rapid diagnosis. BMJ 1998;317:1263-4.
36. 홍상범, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김동순 등. *rpoB* 유전자를 이용한 신속한 다제내성결핵 진단법의 임상적 적용 (초록). 결핵 및 호흡기질환 1999;47(suppl 2):80.
37. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. Antimicrob Agents

- Chemother 1996;40:1053-6.
38. Moghazeh SL, Pan X, Arain T, Stover CK, Musser JM, Kreiswirth BN. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2655-7.
39. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, *et al.* Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. J Clin Microbiol 1999;37:49-55.
40. Narang PK, Lewis RC, Bianchine JR. Rifabutin absorption in humans: relative bioavailability and food effect. Clin Pharmacol ther 1992;52: 335-41.
41. Battaglia R, Pianezzola E, Salgarollo G, Zini G, Strolin Benedetti M. Absorption, disposition and preliminary metabolic pathway of ¹⁴C-rifabutin in animals and man. J Antimicrob Chemother 1990;26:813-22.
42. Blaschke TF, Skinner MH. The clinical pharmacokinetics of rifabutin. Clin Infect Dis 1996;22: S15-21.
-