

□ 원 저 □

결핵균의 rpoB 유전자 PCR-SSCP법에 의한 Rifampicin 내성의 신속 진단*

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

심태선** · 유철규 · 한성구 · 심영수 · 김영환

= Abstract =

Rapid detection of Rifampicin-resistant *M. tuberculosis* by PCR-SSCP of rpoB gene

Tae Sun Shim, M.D.** , Chul-Gyu Yoo, M.D., Sung Koo Han, M.D.,
Young-Soo Shim, M.D., Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Rifampicin(RFP) is a key component of the antituberculous short-course chemotherapy and the RFP-resistance is a marker of multi-drug resistant(MDR) *M. tuberculosis*. rpoB gene encodes the β -subunit of RNA polymerase of *M. tuberculosis* which is the target of RFP. Recent reports show that rpoB gene mutations are the cause of RFP resistance of *M. tuberculosis* and the main mechanism of rpoB gene mutation is point mutation. And PCR-SSCP is a rapid and easy method for detecting point mutations. So we performed PCR-SSCP of rpoB gene of *M. tuberculosis* and compared the result with traditional RFP sensitivity test.

Method : The 27 RFP sensitive *M. tuberculosis* culture isolates and 25 RFP resistant isolates were evaluated. The RFP sensitivity test was done at the Korean Tuberculosis Institute. The DNA was extracted by bead beater method and was amplified with primers TR-8 and TR-9 in a 20ul PCR reaction containing 0.1ul(1uCi) [α - 32 P] - dCTP. After amplification, SSCP was done using non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Then direct sequencing was done in cases of different electrophoretic mobility compared with that of H37Rv. In 19 cases, we compared PCR-SSCP results with patient's clinical course and the results of traditional RFP sensitivity test.

Results : 1) All 27 RFP sensitive *M. tuberculosis* isolates showed the same electrophoretic mobility compared with that of H37Rv. And all 25 RFP resistant *M. tuberculosis* isolates showed different electrophoretic mobility.

2) The mechanism of rpoB gene mutation of *M. tuberculosis* is mainly point mutation.

* 본 연구는 1996년도 보건과학기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임

** 현 주소는 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실

3) The PCR-SSCP results correlate well with traditional RFP sensitivity and patient's clinical response to antituberculous treatment.

Conclusion : The PCR-SSCP of rpoB gene is a very sensitive and rapid method in detecting RFP-resistant *M. tuberculosis*.

Key words : rpoB, MDR(multidrug resistance), SSCP, Mycobacterium, tuberculosis, Rifampicin

서 론

우리나라의 흉부방사선 소견상 폐결핵의 유병율은 1965년에 5.1%였으나 국가결핵관리사업의 결과 꾸준히 감소하여 왔지만 1995년의 전국실태조사에서 아직도 전체 인구의 1.0%가 결핵환자로서 국민건강에 큰 문제가 되고 있으며 전국에는 약 40만명의 결핵환자가 있을 것으로 추정되고 있다. 최근 세계적으로 AIDS의 증가와 함께 다제약제내성결핵균의 증가로 항결핵치료에 중요한 문제점으로 제기되고 있다. 아직 국내에서 AIDS의 유병율은 높지 않지만 AIDS와 무관하게 INH에 대한 내성이 9.2%(1995년), INH와 RFP의 동시내성율이 5.3%에 이를 정도로 높은 내성율을 보여주고 있다. 또한 국내에서도 AIDS 환자가 점점 증가추세에 있으므로 결핵의 유병율 및 내성율이 현재보다 증가할 가능성은 충분하다고 하겠다. 따라서 결핵 약제내성의 신속한 진단이 필수적이며, 특히 결핵 단기치료의 근간이 되는 약제로서 다제약제내성의 지표로 삼는 RFP에 대한 내성을 신속하게 진단하는 일은 필수적이라 하겠다.

최근 분자생물학적 방법의 도입으로 일부 항결핵약제의 내성획득기전이 분자생물학적 수준에서 조명되고 있다. 즉, INH 내성획득에는 *KatG*¹⁾ 유전자와 *inhA*²⁾ 유전자의 돌연변이가 관여하고 RFP 내성획득은 *rpoB*³⁾ 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 보고 되고 있다. 또한 SM내성에는 *rrs* 유전자가^{4,5)}, 그리고 fluoroquinolone의 내성에는

*gyrA*⁶⁾ 유전자의 돌연변이가 관여됨이 보고되고 있다. 특히 RFP 내성에 관여하는 것으로 알려진 *rpoB* 유전자는 돌연변이가 아주 제한된 69bp범위에서 일어나고 돌연변이의 주 기전이 점돌연변이이므로^{3),12),13)}, 최근에 점돌연변이를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 PCR-SSCP(single strand conformational polymorphism)법을 이용하여 RFP내성을 빠르게 진단하여 임상에 적용하려는 노력이 시도되고 있다¹⁸⁾. 이에 본 연구자는 외국과는 다른 결핵의 유병율과 내성율을 가진 우리나라의 결핵환자의 검체에서 배양된 결핵균주를 이용하여 *rpoB* 유전자의 PCR-SSCP를 시행하여 RFP내성을 신속히 진단할 수 있는지에 대하여 알아 보았고, 또한 direct sequencing을 시행하여 *rpoB* 유전자의 돌연변이 양상을 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대상

결핵연구원에서 모든 항결핵약제에 감수성인 H37Rv 표준균주를 제공받았고 환자의 검체에서 배양된 52결핵균주를 대상으로 하였다. 검체들은 결핵연구원에 약제감수성검사를 의뢰하여 RFP내성 25균주와 RFP 감수성 27균주로 판정되었다. 감수성검사 배지로는 Lowenstein-Jensen media를 이용하였으며 절대농도법(absolute concentration method)을 이용하였다^{16),17)}. 이중 RFP내성 18균주를 제외한 34균주에서는 PCR-SSCP결과 판독 후에 감수성검사를 시행하였다. 항결핵화학요법 중 추적검사가

가능하였던 19예를 대상으로 하여 임상경과를 관찰하고 이 결과를 SSCP결과와 비교하였다.

2. 결핵균 DNA의 추출

Hurley 등⁷⁾(1987)의 방법을 약간 수정하여 DNA를 추출하였다. 즉, 1.5ml microcentrifuge tube에 결핵균 검체 200 μ l를 넣은 후, 0.1mm Zirconium Bead 200ul, TEN 용액 100ul, phenol/chloroform/isoamyl alcohol 용액 200 μ l를 혼합한 후 mini-Bead beater에서 3분간 처리하여 세포를 파괴함과 동시에 단백질을 변형시켰다. 검체를 3000rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액 200 μ l를 다른 microcentrifuge tube에 옮기고 Chloroform/isoamyl alcohol 용액 200 μ l를 넣고 3000rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 다른 microcentrifuge tube에 옮겼다. 상층액 100ul를 취하여 3M sodium acetate 10 μ l와 100% 냉동 ethanol 220 μ l를 넣고, -70℃ 냉동고에 15분 방치한 후 10000rpm으로 10분간 원심분리한 다음, 상층액을 vacuum suction을 이용하여 제거하고, 공기중에서 완전히 건조시켰다. 추출된 DNA는 멸균 3차 증류수 100 μ l에 용해시켜서 -20℃에 보관하였다.

3. PCR-SSCP

TR-8과 TR-9 primer를 이용하여 중간에 rpoB 유전자의 codon 311에서 codon 333까지의 부위를 포함하는 157bp 를 중합효소연쇄반응으로 증폭하여 PCR-SSCP를 시행하였다.

1) 중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응은 Perkin ELMER사의 Gene-Amp PCR System 9600을 사용하였다. 반응액은 Korea Biotech. Inc.사의 20ul용 PCR Pre-Mix kit을 이용하였다. 50pmole/ul primer를 0.2ul씩 넣고 [α -³²P]-dCTP 0.1ul(1uCi), DNA 1ul넣은후 18.5ul의

증류수를 넣어서 최종 20ul가 되게 하였다. 반응은 첫번째 cycle은 95℃에서 5분간 반응시켰다. 다음에 95℃에서 30초, 61℃에서 30초, 72℃에서 45초씩 35cycle을 시행하였다. 다음 72℃에서 5분간 반응을 시킨뒤 종료하였다.

2) SSCP

0.75배의 MDE gel과 0.6배의 TBE buffer를 함유하는 75ml에 TEMED 30 μ l와 10% ammonium persulfate 300ul를 섞어 gel을 만들었다. 동위원소가 들어있는 중합효소연쇄반응 산물중 1 μ l를 취하여 SSCP loading 용액 2 μ l와 섞어 95℃에서 5분간 가열 시킨뒤 즉시 얼음에 넣어서 5분간 보관한 뒤에 3 μ l를 loading하고 6 Watt에서 12시간 동안 실온에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 유리판을 분리하여 gel을 3M paper에 붙여서 wrap으로 싸운뒤 80℃에서 2시간동안 gel을 건조시킨 후 X-ray film을 cassette에 넣고 -70℃에서 12시간 동안 autoradiography를 시행하였다.

4. Direct sequencing

동일한 조건으로 PCR-SSCP를 시행하였을 때 H37Rv 와 다른 9가지의 band 양상을 보여준 9개의 균주를 선택하여 sequencing을 시행하였다. 이 결과를 H37Rv 의 염기서열과 비교하였다. sequencing 반응은 Sanger의 dideoxy-sequencing method를 이용하였고 USB사의 Sequenase PCR Product Sequencing Kit(Sequenase version 2.0, Product number US70170)을 사용하였다. 상기의 방법으로 TR-8과 TR-9 primer를 이용하여 시행한 중합효소연쇄반응 산물을 Exonuclease I과 Shrimp alkaline phosphatase로 처리한뒤 0.5pmole을 취하여 sequencing 반응을 시행하였다. sequencing 반응산물과 4ul의 stop solution을 혼합하여 이 중에서 3ul를 취하여 urea를 혼합한 6% polyacrylamide로 만든 vertical gel에

loading 하였다. 55W에서 90분 정도 전기영동을 시행한뒤 fixing solution으로 gel 표면을 씻어 남아있는 urea를 제거하였다. Whatmann 3M paper에 gel을 옮긴 후 Wrap으로 싸우고 gel dryer에서 2시간 동안 건조시켰다. Wrap을 벗기고 overnight 동안 autoradiography를 시행하였다.

5. Primers

사용한 primer는 다음과 같다. primer는 Korea Biotech. Inc.에 의뢰하여 제조하였다.

TR-8 : 5'- TGCACGTCGCGGACCTCCA -3'

TR-9 : 5'- TCGCCGCGATCAAGGAGT -3'

결 과

1. rpoB 유전자 157bp 중합효소연쇄반응 산물의 PCR-SSCP analysis

RFP에 감수성인 27균주 모두 H37Rv와 동일한 band의 양상을 보여주었다. RFP에 내성인 25균주 모두에서 H37Rv와 다른 band의 양상을 보여주었다(Table 1., Fig 1.)

Table. 1. RFP sensitivity and PCR-SSCP results of *M. tuberculosis*

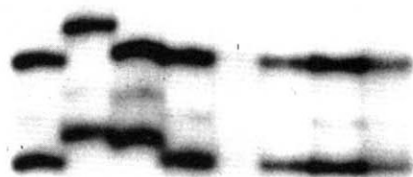
	RFP-S	REP-R	
SSCP(-)	27	0	27
SSCP(+)	0	25	25
	27	25	52

*SSCP(-) : no mobility change compared with H37Rv

*SSCP(+) : mobility change compared with H37Rv

2. Direct sequencing

동일한 조건으로 PCR-SSCP를 시행하였을 때 H37Rv와 다른 9가지의 band 양상을 보여주었다(Fig 2.)



H37 R R R S S S S

Fig. 1. SSCP analysis of rpoB gene 157bp amplicons of *M. tuberculosis* clinical isolates

The lane 1 is H37Rv. Lane 2 and 3 shows different electrophoretic mobility compared with that of H37Rv and turned out to be RFP resistant phenotypes by traditional RFP sensitivity test.

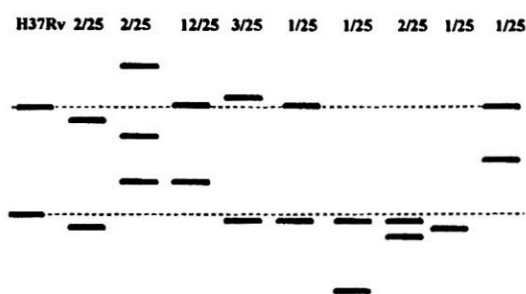


Fig. 2. Different SSCP patterns in 25 RFP resistant *M. tuberculosis*

When electrophoresis was performed at constant conditions, 25 RFP resistant isolates showed 9 different band patterns. If the gel and electrophoresis condition is constant, the fragments with the same mutations will show the same electrophoretic mobility.

H37Rv와 band 양상이 다른 9개의 균주를 선택하여 direct sequencing을 시행하였다. 6균주에서는 1개의 점돌연변이가 발생하여 1개의 아미노산의 변화를 보였고 1균주에서는 같은 codon내에 2개의 점돌연변이가 발생하여 1개의 아미노산의 변화가 있었으며 다른 1에는 2개의 점돌연변이가 다른 codon내에 발생하여 2개의 아미노산의 변화가 있었다(Fig 3., Fig 4.). 나머지 1균주는 codon 531 부위의 band들이 겹쳐져서 염기서열의 자세한 관찰이 불가능했으며 그 이외의 부위에서 돌연변이를 관찰할 수 없었다. 발견된 돌연변이 모두 codon 511 에서 codon 533까지 사이에 존재하였다.

H37Rv	516(Asp)	518(Asn)	522(Ser)	526(His)	531(Ser)					
ctgagccaattcatg	<u>gac</u>	cag	<u>aac</u>	aacccgctg	tcg	gggttgacc	<u>cac</u>	aagcgccgactg	<u>tcg</u>	gcgctg
mutations	tac	cac	ttg	tac(Tyr)	ctc(Leu)	gac(Asp)	cgc(Arg)	tgc(Cys)		
	(Tyr)	(His)	(Leu)							
	gtc									
	(Val)									

Figure 3. rpoB gene mutations detected in 25 RFP resistant M.tuberculosis isolates

All mutations were point mutations. 516 GAC->TAC and 518 AAC->CAC mutations occurred simultaneously in one isolate. Because of the overlapping of the G,A,T,C bands in sequencing, we couldnt find a 531 codon mutations which is the most common mutations reported in rpoB gene of RFP-resistant M. tuberculosis.

3. PCR-SSCP , 감수성검사, 그리고 항결핵요법 후 임상경과의 비교(Table 2.)

항결핵화학요법을 시행하면서 임상경과의 추적 이 가능하였던 19예를 대상으로 하여 PCR-SSCP 결과와 전통적인 감수성검사 결과 그리고 임상경과를 비교 관찰하였다.

치료 2-3개월후 객담도말검사의 음전화 또는 단순흉부방사선검사의 호전을 보인 11예를 good responder군으로 분류하였다. 치료후에도 지속적으로 객담도말 양성이거나 임상증상 및 단순흉부방사선 검사상 악화를 보이거나 임상적으로 수년간

Table 2. Correlations among patients clinical response to antituberculous treatment, and conventional sensitivity, and PCR-SSCP results

	GOOD RESPONDER		POOR RESPONDER	
	RFP-S	RFP-R	RFP-S	RFP-R
SSCP(-)	11	0	1(?)	0
SSCP(+)	0	0	0	7
	11	0	1	7
	11		7+1(?)	

고 찰

의 난치성 결핵의 경과를 보인 7예를 poor responder군으로 분류하였다. good responder 11예 모두 감수성검사서 RFP에 감수성이었고 PCR-SSCP에서 H37Rv와 동일한 band양상을 보여주었다. poor responder 7예 모두에서 RFP에 내성이었으며 PCR-SSCP에서 H37Rv와 다른 양상의 band를 보여주었다.

항결핵화학요법 3개월후에도 단순흉부방사선의 호전이 없고 객담도말검사상 AFB가 지속적으로 양성이어서 내성이 의심되는 1예에서는 전통적인 감수성검사상 RFP에 감수성균주이었고 PCR-SSCP에서도 H37Rv와 동일한 양상의 band를 보여주었다.

RFP이 포함된 같은 1차 약제로 2개월 더 치료하며 경과를 관찰한 결과 임상상과 단순흉부방사선소견의 호전을 보였으며, 추적검사한 내성검사에서도 RFP 감수성으로 판정되었고 SSCP결과도 H37Rv와 동일한 양상을 보여주었다.

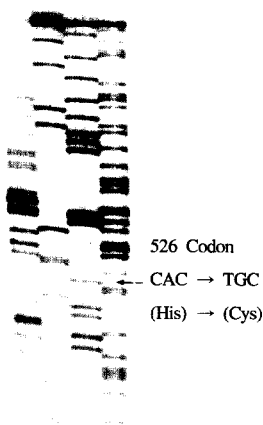


Fig. 4. Direct sequencing of RFP-resistant *M. tuberculosis* isolates.

This RFP-resistant *M. tuberculosis* isolate shows two consecutive point mutations in codon 526 of *rpoB* gene

1965년 Rifampicin이 합성되어 항결핵화학요법에 사용된 이후로 단기로법이 가능하게 되었고 국가적인 결핵퇴치사업과 생활수준의 향상으로 결핵의 유병율은 계속 감소추세에 있다. 그러나 1980년대 후반부터 서구에서는 AIDS의 증가와 함께 결핵의 유병율이 다시 급속하게 증가하였고 특히 다제약제내성균주의 증가가 큰 문제로 대두되었다. 특히 우리나라에서는 INH에 대한 내성이 9.2%(1995년), RFP에 대한 내성이 5.3%에 이를 정도로 AIDS와 관련 없이 과거부터 높은 약제내성율을 보여왔으며, 최근 국내에서도 AIDS가 증가추세에 있으므로 약제내성결핵균이 더욱 증가할 가능성이 있다. 특히 RFP에 대한 내성은 다제약제내성의 지표가 될만큼 중요한 역할을 차지하고 있는데 국내의 RFP에 대한 내성율이 5.3%인데 INH와 RFP에 대한 동시내성이 5.3%임을 감안하면 RFP내성균주는 대부분 INH에도 내성임을 알 수 있다.

약제내성의 문제점은 대부분의 경우에 난치성 결핵의 경과를 거치고 또한 약제내성의 진단에 오랜 시간이 걸리므로 지속적인 감염원이 된다는 점이다. 현재로서는 치료중 또는 치료전에 약제내성이 밝혀지면 치료약제를 바꾸는 소극적인 대처가 유일한 방법이다. 그러나 통계에서 보는 바와 같이 한 가지 약제에 내성이면 다른 약제에도 동시에 내성인 경우가 많고, 현재 임상에서 사용 가능한 항결핵약제는 10여종에 불과하나 결핵균의 특성상 최소 3-4종의 약제를 동시에 투여하는 다제병용요법이 원칙인 실정을 감안하면 일단 결핵균이 내성을 획득하거나 약제내성균에 감염되면 완치의 가능성은 떨어진다고 할 수 있다. 그러나 전통적인 감수성검사방법은 배양에 4-6주가 걸리고 감수성검사에 2-4주가 걸릴 정도로

오랜 시간을 필요로 한다. 따라서 약제내성을 신속하게 진단하고 극복할 수 있는 적극적인 치료법의 개발이 시급히 요청되고 있다. 이를 위해서는 항결핵약제들의 정확한 작용기전과 내성의 기전에 대한 연구가 필수적이다.

과거부터 *Escherichia coli*에서는 RNA polymerase를 coding하는 유전자의 특정 염기의 치환이 rifampicin내성과 연관되어 있음이 알려져 왔고¹⁴⁾, 결핵균에서도 RFP 내성은 RNA polymerase의 변화 때문이라고 생각하였지만 정확한 기전은 모르고 있었다¹⁵⁾. 최근 분자생물학적 방법의 도입으로 인해 항결핵약제의 내성획득기전이 분자생물학적 수준에서 조명되면서 RFP 내성획득은 *rpoB*³⁾ 유전자의 돌연변이에 의한 것으로 보고되고 있다. *rpoB* 유전자는 RFP의 작용부위인 RNA polymerase의 β -subunit을 coding하는 유전자로 1993년 Telenti 등에 의하여 결핵균에서 처음 밝혀졌다. 보고에 의하면 RFP내성에 관여하는 *rpoB* 유전자의 돌연변이는 대부분 점돌연변이이며 이 돌연변이들은 아주 제한된 69bp범위에서 일어나므로, 최근에 점돌연변이를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 PCR-SSCP(single strand conformational polymorphism)법을 이용하여 RFP내성을 신속하게 진단하여 임상에서 적용하려는 노력이 시도되고 있다.

SSCP는 non-denaturing polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 시행하는데, 같은 크기의 DNA 분절이라도 염기서열의 차이에 따라 이동성의 차이를 나타낸다. 그러므로 점돌연변이로 1개의 염기만 바뀌어도 DNA의 conformational change를 일으켜서 돌연변이를 일으키지 않은 같은 크기의 DNA분절과 이동성의 차이를 보여 점돌연변이 여부를 쉽게 구분할 수 있는 방법이다. 전기영동에서 적절하게 band가 구분되기 위해서는 gel의 상태와 성분 그리고 전기영동의 조건등이 중요하다. 본 연구에서 처음에는 다양한 농도의 polyac-

rylamide gel에 glycerol을 다양한 농도로 섞어 보았고 전기영동의 조건도 다양하게 바꿔 보았으나 band가 구분이 용이하지 않았다. MDE gel(Hydrolink, AT Biochem Inc., Malvern, Pa.)을 사용하면 band가 뚜렷하게 구분되었고, 이후 동일한 gel 성분과 동일한 조건에서 전기영동을 시행하였다. 대부분의 다른 보고들은 66예중 64예³⁾, 8예중 8예¹⁰⁾, 13예중 13예⁹⁾, 29예중 28예⁸⁾에서 SSCP로 RFP내성을 발견해서 SSCP가 아주 예민한 검사임을 보여주고 있다. 본 연구에서는 RFP내성 25균주 모두에서 전기영동상 H37Rv와 다른 band의 위치를 보였고 RFP감수성 27균주 모두는 H37Rv와 동일한 band의 위치를 보여 주어 전통적인 약제감수성검사와 100% 일치하는 소견을 나타내었다. 이는 다른 보고들과도 일치하는 결과이다. 그러나 우리의 연구에서는 발견되지 않았지만 다른 보고에 의하면 silent mutation도 발견되어³⁾ RFP에 감수성인 균주이면서도 SSCP에서 양성 소견을 보이는 경우가 있었다. 우리의 목적은 SSCP로 RFP내성을 빠르게 진단하여 이를 임상에서 적용하려는 것이므로 이런 위양성(silent mutation), 즉 RFP감수성이면서 SSCP검사상 양성, 을 구분하여야만 SSCP결과를 믿고 RFP사용여부를 결정할 수 있을 것이다. 물론 sequencing을 시행하면 silent mutation여부를 알 수 있겠지만 모든 예에서 sequencing을 시행하는 것은 아직 어렵다고 본다.

그러므로 위양성을 간편하게 구분하기 위해서는 일정한 gel성분과 일정한 전기영동의 조건을 맞추어서 반복하여 SSCP를 시행하여 silent mutation시 보이는 일정한 band의 양상을 찾아내고 실제 임상에서 적용시 이와 동일한 band의 양상이 나타나면 sequencing을 통하여 silent mutation여부를 확인하면 될 것이다. 실제로 동일한 조건으로 몇 예에서 SSCP를 시행하였을 때 band 양상이 같은 경우는 같은 mutation이 있음을 확인하였다.

본 연구에서 sequencing의 결과 돌연변이는 모두가 점돌연변이였으며 silent mutation은 없었다. 526 codon의 점돌연변이가 제일 많았다. 1예에서는 codon 516이 GAC(Val) -> TAC(Tyr)로, codon 518이 AAC(Asn) -> CAC(His)로 2개의 아미노산이 바뀐 경우도 있었다. SSCP에서 양성으로 보였던 9가지 양상중 1가지에서는 12균주가 같은 band의 양상을 보였는데(Fig. 2.), sequencing에서 531codon 부위가 band들이 겹쳐서 염기서열을 확인 못한 것을 제외하고는 다른 부위에서는 돌연변이가 없었다.

다른 보고들을 보면 531 codon의 돌연변이가 51.5%³⁾, 31% 정도로 제일 흔하게 발견되는 부위이므로, 본 연구에서 나타난 돌연변이의 양상이 다른 보고와 유사한 점을 고려하면 아마도 이 12균주는 531 codon부위에 점돌연변이가 있을 가능성이 크겠다. 임상경과를 추적할 수 있었던 19예에서는 항결핵치료에 대한 임상반응과 약제감수성검사 그리고 SSCP의 결과를 비교하였다. good responder군 12예는 모두 SSCP에서 음성의 결과를 나타내었고 나중에 시행한 감수성검사에서도 RFP 감수성균주로 판명되었다. poor responder군 7예에서는 모두 SSCP에서 양성소견을 나타내었고, 나중에 시행한 감수성검사 결과도 내성으로 판명되었다. 구분이 애매했던 1예는 감수성검사와 SSCP 소견 모두 감수성균주로 나와서 RFP를 포함한 같은 1차약을 지속적으로 투약하였으며 2 개월 후 추적검사에서 호전되는 소견을 보였다. 또한 추적검사를 감수성검사나 SSCP모두 RFP 감수성으로 판명되었다. 이로써 SSCP 결과는 감수성검사와 항결핵치료중의 임상 경과와 밀접한 관계를 보여줄 수 있다.

이상의 결과로 RFP의 RNA polymerase의 subunit을 coding하는 rpoB 유전자의 PCR-SSCP법에 의한 돌연변이의 검출은 RFP내성을 신속하게 진

단할 수 있는 아주 유용한 방법으로 기대된다. 그러나 이 연구는 배양된 균주를 대상을 한 결과이다. 따라서 임상적으로 빠르게 내성여부를 확인하기 위하여는 환자의 객담같은 직접임상검체에서 PCR-SSCP를 시행하여야만 한다. 또한 최근의 보고에 의하면 rpoB 유전자는 다른 종의 Mycobacterium과 G-C성분이 풍부한 다른 세균들에서도 비특이적으로 증폭되므로 결핵균에만 특이적인 염기서열을 primer로 사용하여야 한다고 하였다¹⁹⁾. 본 연구자도 예비실험으로 몇예의 객담 검체에서 TR-8과 TR-9 primer로 중합효소연쇄반응을 시행하였다. IS6110분질의 중합효소연쇄반응이 음성임에도 불구하고 TR-8과 TR-9 primer에서는 많은 비특이적인 band가 관찰되었으나, 결핵균에 특이적으로 보고된 primer¹⁹⁾를 이용한 중합효소연쇄반응에서는 IS6110분질을 이용한 결과와 일치하는 결과를 확인하였다. 본 연구에서는 배양된 결핵균주의 집락을 대상으로 하였으므로 TR-8과 TR-9 primer를 이용하여도 결과의 분석에 문제가 없었지만, 향후 직접임상검체를 대상으로 한 연구에서는 결핵균에만 특이적인 primer를 사용하여야만 할 것이다. 또한 동위원소의 사용으로 방사선에의 노출이 우려되는데 이는 silver staining과 같은 방법으로 대체할 수 있으리라 생각된다. 이상의 문제가 해결되면 결핵균 rpoB 유전자의 RCR-SSCP법은 지금의 감수성검사를 대체하여 신속하게 결핵균의 RFP내성을 진단할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

연구배경 : Rifampicin(RFP)은 항결핵 단기치료의 근간이 되는 약제로서 RFP에 대한 내성을 다제약제내성의 지표로 보기도 한다. rpoB유전자는 RFP이 결합하여 약리작용을 나타내는 RNA poly-

merase의 β -subunit을 coding하는 유전자이다. 다른 보고들에 의하면 RFP내성균주에서 rpoB 유전자의 돌연변이가 관찰되고 특히 점돌연변이가 중요한 기전임이 알려지고 있다. 이에 저자는 rpoB 유전자의 점돌연변이를 쉽게 관찰할 수 있는 PCR-SSCP법을 이용하여 신속하게 RFP에 대한 내성여부를 확인할 수 있는지에 대하여 알아보았다.

방법 : 전통적인 약제내성검사상 RFP에 내성을 보이는 25 배양균주와 RFP에 감수성인 27배양균주 그리고 표준균주인 H37Rv를 대상으로 하였다. TR8, TR9 primer를 이용하여 rpoB 유전자의 511 codon에서 533 codon 부위를 포함하는 157bp의 DNA를 증폭한 후 폴리아크릴아마이드젤 전기영동으로 PCR-SSCP를 시행하여 band의 이동양상을 비교하였다. 그리고 H37Rv와 다른 band의 양상을 보인 균주에서 direct sequencing을 시행하여 H37Rv의 염기서열과 비교하였다. 또한 임상경과를 추적할 수 있었던 19예에서 임상경과와 전통적인 감수성검사 결과, 그리고 PCR-SSCP결과를 비교하였다.

결과 : 1) PCR-SSCP결과로 RFP감수성 27균주 모두에서 H37Rv와 동일한 band의 양상을 보였고, RFP내성 25균주 모두에서 H37Rv와 다른 band의 양상을 보여서 전통적인 RFP 감수성검사와 rpoB 유전자의 PCR-SSCP 사이에 100% 일치하는 결과를 보여주었다.

2) rpoB 유전자 돌연변이의 주된 기전은 점돌연변이였다.

3) rpoB 유전자의 PCR-SSCP 결과는 전통적인 RFP감수성검사나 항결핵치료의 임상경과와 잘 일치하였다.

결론 : 결핵균 rpoB 유전자의 PCR-SSCP에 의한 돌연변이의 확인은 RFP내성 결핵균의 신속한 진단에 아주 유용한 검사로 기대된다. 향후 직접임상검체를 대상으로 한 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Zhang Y, Heym -B, Allen B, Young D, Cole ST : The catalase- peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature Aug 13 ; 358 : 591-3, 1992
- 2) Banerjee A, Dubn E, Quemard A, Balasubramanian V, Um K S, Wilson T, Collins D, de Lisle G & Jacobs W R : inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science 263 : 227-30, 1994
- 3) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston M J, Matter L, Schopfer K & Bodmer T : Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 341 : 647-50, 1993
- 4) Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. Antimicrob-Agents-Chemother Mar; 37(3) : 414-8, 1993
- 5) 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 Nov ; 10(3) : 521-7, 1993
- 6) Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrob-Agents-Chemother. Apr ; 38(4) : 773-80, 1994
- 7) Hurley SS, Splitter Ga, Welch RA : Rapid lysis technique for *Mycobacterial* series. J Clin Microbiol 25 : 2227, 1987

- 8) Morris S, Bai G H, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M & Rouse D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **171** : 954-960, 1995
- 9) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs-WR Jr, van-Embden JD, Grosset JH, Cole ST. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis : a molecular study. *Lancet* Jul 30; **344** : 293-8, 1994
- 10) Donnabella V, Martiniuk F, Kinney D, Bacerdo M, Bonk S, Hanna B & Rom W N. 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* **1127** : 639-643 , 1994
- 11) 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* **37** : 2054-8, 1993
- 12) Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick M R, Wanger A, Kreiswirth B N & Musser J M : 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* **32** : 1095-1098, 1994
- 13) Donnabella V, Martiniuk F, Kinney D, Bacerdo M, Bonk S, Hanna B & Rom W N : 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* **1127** : 639-643, 1994
- 14) Jin D and Gross C : Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J. Mol. Biol.* **202** : 45-58, 1988
- 15) Yamada T, Nagata A, Ono Y, Suzuki Y, Yamanouchi T : Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **27** : 921-24, 1985
- 16) Inderlied CB and Salfinger M : Antimicrobial agents and susceptibility tests : *Mycobacteria*., *Manual of clinical Microbiology.* **119** : 1385-1404, 1995
- 17) Inderlied CB : Antimycobacterial agents : In vitro susceptibility testing, spectrums of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biological fluids, Williams and Wilkins, *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd edition, 134-197, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1991
- 18) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, and Sekiya T : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** : 2766-2770, 1989
- 19) Whelen AC, Felmlee TA, Hunt JM, Williams DL, Roberts GD, Stockman L, & Persing DH. Direct genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* **33** : 556-561, 1995