

# Rifampin내성결핵의 조기 진단을 위한 RNA/RNA duplex, base pair-mismatch assay와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay 의 유용성

연세대학교 의과대학 내과학교실

홍성관 · 장경희 · 박윤수 · 조정호 · 김효열 · 송영구 · 김준명

## Use of RNA/RNA Duplex, Base Pair-mismatch Assay and 3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT) Assay for Rapid Detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Sung Kwan Hong, M.D., Kyung Hee Chang, M.D., Yoon Soo Park, M.D., Jeong Ho Cho, M.D.,  
Hyo Yeol Kim, M.D., Young Goo Song, M.D. and June Myung Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background :** Multidrug-resistant tuberculosis is an increasing concern for public health in many parts of the world. We have evaluated the specificity and sensitivity of the mismatch assay and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay in detecting rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

**Methods :** Eleven rifampin-susceptible and 15 rifampin-resistant *M. tuberculosis* strains were isolated from clinical specimens obtained from patients in Yonsei University College of Medicine, Severance Hospital. RNA/RNA duplex, base pair-mismatch assay (Mismatch Detect II kit, Ambion) and MTT assay were performed.

**Results :** The specificity and sensitivity of detection of rifampin resistance were 91% and 87% in mismatch assay and 73% and 67% in MTT assay, respectively.

**Conclusion :** These results suggest the usefulness of mismatch assay in detecting rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

**Key Words :** Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Mismatch assay, MTT assay

## 서 론

결핵은 아직도 감염병 분야에서 사망의 가장 많은 원인 질환이다. 전세계적으로 1년에 약 800만 명의 신환이 발생하며, 290만 명의 사망의 원인이 되고있다. 최근 인간면역결핍 바이러스 감염의 증가와 함께 더욱 증가하고 있는 추세이며, 이런 상황에서 다제약제내성 결핵의 출현은 결핵의 관리와

치료를 더욱 어렵게 하고 있다(1, 2). 다제약제내성 결핵은 결핵의 치료에 가장 중요한 역할을 하는 rifampin과 isoniazid에 모두 내성을 나타내므로, 이들의 내성 여부를 빨리 찾아내는 것은 결핵의 전파방지와 치료에 있어서 매우 중요한 일이라 하겠다.

대부분의 rifampin-내성 결핵은 *rpo β* 유전자에 돌연변이가 존재하며, 이들의 약 90%에서는 isoniazid에도 내성을 보인다(3, 4). 따라서 이러한 다제약제내성 결핵의 진단을 위해 *rpo β* 유전자의 돌연변이를 찾기 위한 많은 분자생물학적 기법이 시도되고 있으며, 이 중 한 방법인 RNA/RNA

본 논문은 1999년도 교수연구비의 지원에 의해 이루어졌음  
접수: 2002년 2월 28일, 승인: 2002년 6월 10일  
교신저자: 김준명, 서울시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 의과대학 내과학교실  
Tel: 02)361-5410, Fax: 02)393-6884  
E-mail: jmkim@yumc.yonsei.ac.kr

duplex, base pair-mismatch assay법은 비교적 신속하고 저렴한 방법으로 알려져 있다(5). RNA/RNA duplex, base pair-mismatch assay는 객담 또는 배양된 검체를 대상으로 한 분자생물학적 기법인데 비해, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 를 이용한 다제약제내성 결핵의 검출법은 세포의 생활력을 측정하는 방법으로, rifampin에 노출된 후 결핵균의 생존여부를 측정함으로써 내성결핵을 진단할 수 있는 보다 저렴하고 간편한 방법이다(6).

본 연구는 이러한 두 가지 방법으로 다제약제내성 결핵을 조기 진단 함으로서, 임상에서 결핵환자를 관리하고 적절히 치료하는데 도움을 주고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

균주. 연세대학교 의과대학 세브란스병원에 내원한 결핵 환자들로부터 얻은 객담 중 결핵균 항산성도말검사서 양성인 객담을 okawa 배지에서 배양하여 약제감수성 검사를 시행하였다(대한결핵협회). 이렇게 해서 얻은 결핵균 중 약제감수성 *M. tuberculosis* 11균주와 rifampin-내성 *M. tuberculosis* 15균주를 대상으로 하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 균배양

MTT assay를 위하여, 26균주를 10% OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase)를 첨가한 7H9 액체 배지에서 37℃로 10일간 더 배양하였다. 배양 후 균주의 농도는 분광광도계 (620nm 에서 흡광도 1은 균주  $2 \times 10^9$  균주/ml)로 측정하였다.

#### 2) RNA/RNA duplex, base pair-mismatch assay

##### (1) DNA 추출

각 균주에 chloroform 50  $\mu$ l와 distilled water 50  $\mu$ l 를 혼합하여 80℃에서 30분 간 방치하였다. 그 후 검체를 4℃로 냉각하고 원심분리(12,000 rpm, 5분)하여 상층액을 취하여 이 상층액(DNA)으로 중합효소연쇄반응을 시행하였다.

##### (2) Primer

Primer는 sense: 5'-GCA-GAC-GCT-GTT-GGA-AAA-CT-3'-와 anti-sense: 5'-TAG-TCC-ACC-TCA-GAC-GAG-GG-3'를 사용하였다.

##### (3) 중합효소연쇄반응(PCR)

DNA 주형(template) 5  $\mu$ l를 취하여 sense, antisense-primer 각 2.5  $\mu$ l씩과 2.5 mM dNTP 2.5  $\mu$ l, 그리고 Taq polymerase 1U를 혼합하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 중합효소연쇄반응은 94℃, 20sec, 55℃, 20sec, 72℃, 40sec로 30회 실시하였다.

#### (4) RNA 전사(transcription) 및 RNA/RNA 부합화(hybridization)

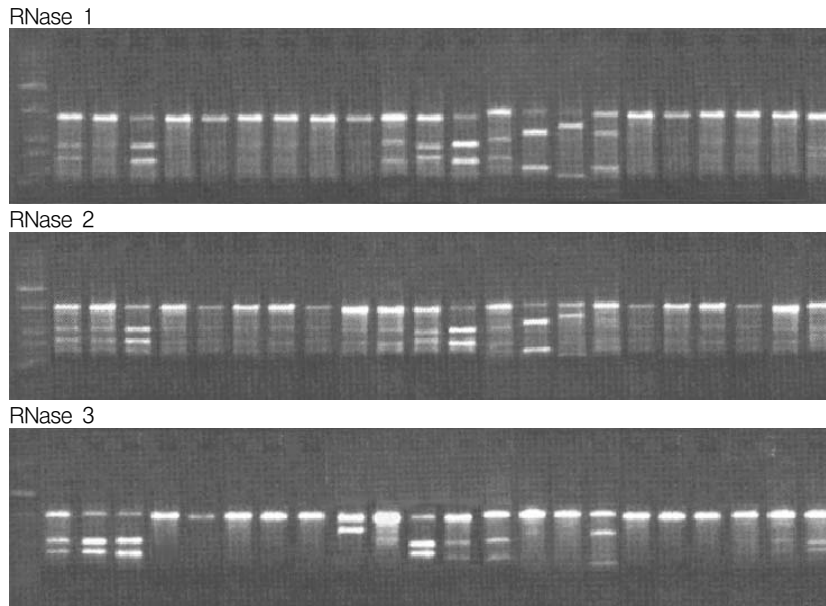
Mismatch Detect II kit (Ambion, Austin, Tex.)를 이용하여 실험검체와 참고검체의 중합효소연쇄반응 생산물을 단일 가닥 RNA로 전사(transcription)시키고 전사 된 검체를 부합화 용액(hybridization solution)으로 RNA/RNA 이중구조로 부합화(hybridization) 시켰다. 실험검체와 참고검체 각 2  $\mu$ l, 10X 전사용액(transcription buffer) 1  $\mu$ l, rNTP mix 1  $\mu$ l, T7 RNA polymerase 1  $\mu$ l, SP6 RNA polymerase 1  $\mu$ l를 취하여 37℃에서 1시간 방치하였다. 그 후 부합화 용액 10  $\mu$ l를 가한 후 94℃에서 3분간 가열하고 상온에서 5분간 방치하였다.

#### (5) RNA 분해효소 처리 및 RNA/RNA 이중구조 검출

각 부합화 반응물 4  $\mu$ l를 100배로 희석한 RNase (Mismatch Detect II kit)와 혼합하여 37℃에서 45분 간 방치하였다. RNase gel-loading buffer 4.5  $\mu$ l를 추가하여 RNase 반응을 멈추고 반응물은 3% agarose-gel에 부하 시킨 후 상온에서 1시간 동안 전기영동을 시행하였다. 전기영동에서 단일밴드를 보이는 경우 rifampin-감수성 *M. tuberculosis*, 다중밴드를 보이는 경우 rifampin-내성 *M. tuberculosis*로 해석하였다.

#### 3) MTT assay

10% OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase)를 첨가한 7H9 액체 배지에서 37℃로 10일간 배양된 rifampin-감수성 *M. tuberculosis* 11 균주와 rifampin-내성 *M. tuberculosis* 15 균주, 그리고 내성 균주 5%와 감수성균주 95%를 혼합한 검체 1주를 대상으로, 각 균주  $10^9$ /ml를 96-well microtiter plate 각 칸에 균주 부유액 50  $\mu$ l와 다양한 농도의 rifampin (0, 0.1, 1.0, 10, 100  $\mu$ g/ml) 을 각 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 72시간 배양하였다. MTT는 PBS (pH 7.2)에 5 mg/ml로 혼합하여 각 칸에 10  $\mu$ l 씩 첨가한 후 37℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양된 검체는 분광광도계로 570nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생존을 확인하여, 감수성균과 내성균을 감별하였다. 이 때 rifampin 첨가시의 흡광도를 첨가하지 않았을 때의 흡광도로 나눈 값을 상대적 흡광도(relative optical density units, RODU)로 정의하여 상대적 흡광도가 0.5 이상인 경우 rifampin-내성 *M. tuberculosis*, 그리고 상대적 흡광



**Figure 1.** RNA/RNA duplex, base-pair-mismatch assay single band; rifampin-susceptible *M. tuberculosis*, poly band; rifampin-resistant *M. tuberculosis*.

도가 0.2 이하인 경우 rifampin-감수성 *M. tuberculosis*로 하였다(6).

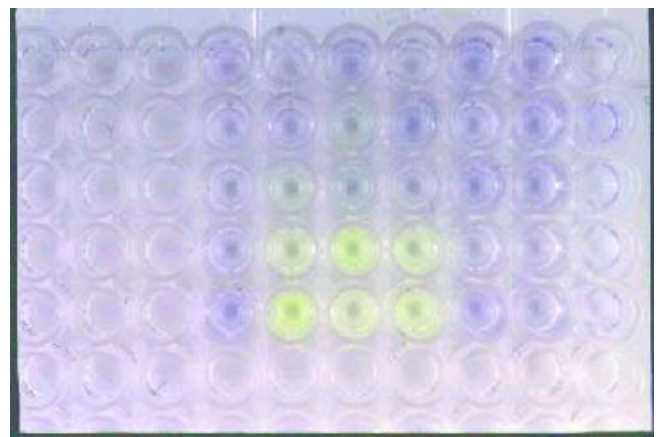
## 결 과

### 1. RNA/RNA mismatch assay

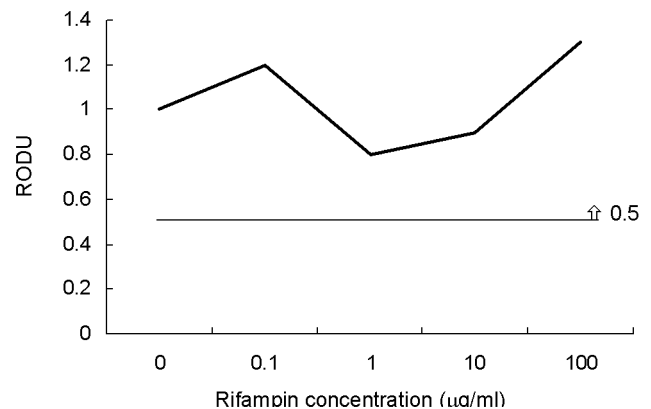
배양 후 약제 감수성 검사 결과 상 rifampin-내성인 결핵균주 15균주 중 13균주가 mismatch assay 후 전기영동에서 다중밴드를 보여 내성으로 나타났으며, 감수성균주 11균주 중 10균주가 단일밴드를 보여 감수성으로 나타났다. 민감도와 특이도는 각각 87%, 91%를 보였다(Figure 1).

### 2. MTT assay

배양 후 약제 감수성 검사 결과 상 rifampin-내성인 결핵균주 15균주 중 10균주가 상대적 흡광도 0.5 이상으로 내성으로 나타났으며(Figure 3), 감수성균주 11균주 중 7균주가 상대적 흡광도 0.2 이하로 감수성으로 나타났으며 이때의 rifampin의 농도는 1  $\mu$ l/ml 이상이였다(Figure 4). 내성 균주 5%와 감수성균주 95%를 혼합한 검체에서는 상대적 흡광도 0.5 이상으로 내성으로 나타났다(Table 1). 또한 MTT assay 후 rifampin-내성인 결핵균주는 염료의 색을 자주색으로 변화시키었으며, 감수성인 경우 염료색의 변화는 관찰되지 않았다(Figure 2). 민감도와 특이도는 각각 67%, 73%를 보였다.



**Figure 2.** MTT assay. Yellow color; rifampin-susceptible *M. tuberculosis*, Purple color; rifampin-resistant *M. tuberculosis*.



**Figure 3.** MTT assay (rifampin-resistant *M. tuberculosis*): Relative OD Unit>0.5 : rifampin-resistant *M. tuberculosis*.

Table 1. Optical Density (OD)/relative Optical Density Unit (RODU) of *Mycobacterium tuberculosis* and MTT Mixture

Rifampin conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	OD (RODU)						
	A	B	C	D	E	F	H
0	0.288 (1.0)	0.310 (1.0)	0.250 (1.0)	0.322 (1.0)	0.295 (1.0)	0.412 (1.0)	0.373 (1.0)
0.1	0.351 (1.2)	0.279 (0.9)	0.294 (1.2)	0.313 (1.0)	0.371 (1.3)	0.354 (0.9)	0.299 (0.8)
1	0.302 (1.0)	0.397 (1.3)	0.211 (0.8)	0.196 (0.6)	0.210 (0.7)	0.489 (1.2)	0.305 (0.8)
10	0.255 (0.9)	0.212 (0.7)	0.315 (1.3)	0.042 (0.1)	0.031 (0.1)	0.030 (0.1)	0.324 (0.9)
100	0.260 (0.9)	0.257 (0.8)	0.330 (1.3)	0.056 (0.2)	0.027 (0.1)	0.050 (0.1)	0.247 (0.7)
Results	R	R	R	S	S	S	R

R: resistant, S: susceptible, OD: Optical density, RODU: Relative Optical density Unit

A, B, C: rifampin-resistant *M. tuberculosis*, D, E, F: rifampin-susceptible *M. tuberculosis*, H: susceptible strain 95% and resistant strain 5% mixture

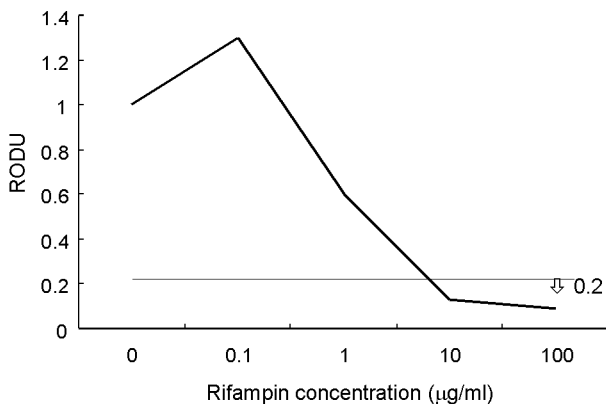


Figure 4. MTT assay (rifampin-susceptible *M. tuberculosis*): Relative OD Unit<0.2: rifampin-susceptible *M. tuberculosis*.

## 고 찰

오늘날까지 결핵은 감염질환 중 사망의 가장 큰 원인질환으로 남아있다. 1995년 현재, 국내의 결핵균 양성 유병률은 0.22%이며, 특히 30세 미만의 결핵감염률은 15.5%에 이른다. 이 중 약제내성 결핵은 9.9%이고, 특히 isoniazid와 rifampin에 동시 내성을 지닌 다제약제내성 결핵이 5.3%로, 이들의 신속한 진단과 치료는 감염자를 치료하는 것 이외에 결핵 전파의 사슬을 끊는 데에도 중요한 의미가 있다(1, 2).

최근 다제약제내성 결핵의 분자생물학적 이해에 많은 관심이 집중되고 있으며, 특히 isoniazid와 rifampin의 내성에 많은 연구가 진행되고 있다. Isoniazid-내성의 주된 기전으로는 *katG* 유전자의 돌연변이가 알려져 있으나 isoniazid-내성 결핵의 약 40%에서 *wild type katG* 유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 또 다른 유전자인 *inhA* 가 연구되어졌으나 이는 낮은 정도의 내성을 발휘하는 것으로 보고되었다(7, 8). Kim 등(9)은 마이코박테리움종의 감별진단을 위하여 RNA 중합효소의  $\beta$  subunit를 부호화 하는 *rpo \beta* 유전

자의 서열을 분석 한 바 있다. 이러한 *rpo \beta* 유전자는 다제약제내성 결핵의 진단에도 유용한데, rifampin-내성 결핵 균주의 96%에서 *rpo \beta* 유전자의 돌연변이가 존재한다고 보고되었으며, 또한 rifampin-내성의 약 90%에서 isoniazid에도 내성을 갖는다는 사실이 알려져 있다(3, 4). 따라서 rifampin-내성이 곧 다제약제내성 결핵의 표지자이며, 이러한 *rpo \beta* 유전자의 돌연변이에 대한 신속한 분자생물학적 검사 방법인 RNA/RNA duplex, base pair-mismatch assay는 그 임상적 유용성이 매우 크다고 할 수 있다. 지금까지 알려진 내성결핵의 분자생물학적 검사방법으로는 PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP), PCR-heteroduplex formation analysis (HAD), 그리고 line probe assay (LiPA) 등이 있다. 이 중 SSCP법은 배양된 검체에 비해 객담을 이용한 직접검사에서는 결과가 좋지 않은 것으로 알려져 있으며, HAD법은 돌연변이와 *wild type*의 구분이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 또한 LiPA법은 특정부위의 돌연변이 검색에 한정한 단점이 있다(10-12). 그에 반해 mismatch assay는 *rpo \beta* 유전자 부위를 중합효소연쇄반응으로 증폭하여 RNA로 전사한 후 이중나선으로 부합화 시키고, *rpo \beta* 유전자의 돌연변이에 선택적인 RNA 분쇄효소를 처리하여 전기영동함으로써 돌연변이 부위를 찾아내는 방법으로, 비교적 적은 비용으로 더 많은 부위의 돌연변이를 찾아낼 수 있는 장점이 있고, 특히 그 민감도와 특이도가 매우 높은 것으로 알려져 있다. 또한 결핵균이 항산성도말검사서 약양성을 나타내기 위해 50-100 균주/ $\mu\text{l}$ 가 필요한데, 본 검사법은 도말양성 검체 1-2  $\mu\text{l}$  먼 균의 약제내성을 알 수 있다(5).

1997년 Nash 등(5)은 rifampin-내성 결핵을 진단하는데 있어서 RNA/RNA duplex, base-pair-mismatch assay의 민감도와 특이도를 96%, 100%로 보고한 바 있으며, 1998년 Simon 등(10)은 민감도와 특이도를 각각 100%로 보고한 바 있다. 모두 26검체로 RNA/RNA duplex, base-pair-mis-

match assay를 시행한 본 연구에서는 rifampin-내성 결핵균 진단에 있어 민감도 87%, 특이도 91%를 나타내어, 빠른 시간 내에 비교적 정확한 진단율을 보여주었다. 그러나 본 연구는 중합효소연쇄반응이나 부합화반응 등의 전문적인 기술을 필요로 하며 검사 시 오염 등에 의한 오차의 가능성이 있다는 단점을 가지고 있다.

이러한 분자생물학적 검사방법에 비해 더 값싸고 간단한 약제내성 결핵의 진단법이 MTT assay를 이용한 방법이다. MTT는 황색의 염료로써 살아있는 세포에서 mitochondrial dehydrogenase에 의해 환원되어 자주색의 불용성 MTT formazane 결정체를 형성하며, 이를 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정 함으로써 정량화 할 수 있다. 이 방법은 검사를 위한 검체를 얻기 위해 약 3-4주 간의 배양기간을 필요로 하지만 검사법 자체는 72시간이면 결과를 확인 할 수 있으며, 내성균주가 전체균주의 1% 이상이면 진단이 가능하다. MTT assay를 통하여 균주의 생존여부를 흡광도, 또는 검체의 색깔 변화로 알 수 있으며, 내성과 감수성의 감별이 가능하다는 특징이 있다. 1998년, Robert 등(6)이 MTT assay를 통해 내성균과 감수성균의 흡광도를 측정하여 상대적 흡광도 0.5 이상일 때 내성균주, 0.2 이하일 때 감수성균주로 두 군의 감별이 가능하다는 결과를 제시한 바 있다. MTT assay법을 통한 본 연구에서는 내성균주가 전체균주의 5%일 때에도 내성균주로 진단되어 검사의 정확도를 보여 주었으나, 전체적으로 낮은 민감도와 특이도를 보여 임상유용의 한계를 보여 주기도 하였다.

결론적으로, rifampin-내성 결핵의 신속하고 정확한 진단을 위해 시행한 본 연구에서 MTT assay는 더욱 값싸고 간단하기는 하나 민감도, 특이도가 낮았으며, RNA/RNA duplex, base-pair-mismatch assay는 임상에서 rifampin-내성 결핵의 진단에 유용한 방법임을 보여 주었다. 그러나 본 연구는 이미 배양된 검체를 대상으로 하였기 때문에 향후 객담을 이용한 직접검사의 결과가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**목적 :** Rifampin-내성 결핵의 조기 진단을 위하여 RNA/RNA duplex, base pair-mismatch assay와 MTT assay의 민감도와 특이도를 알아 보고, 이를 통하여 임상에서 결핵환자를 관리하고 적절히 치료하는데 도움을 주고자 하였다.

**방법 :** 연세대학교 의과대학 세브란스병원에 내원한 결핵 환자들로부터 얻은 객담 중, rifampin-감수성 *M. tuberculosis* 11균주와 rifampin-내성 *M. tuberculosis* 15균주를

대상으로 하여, RNA/RNA duplex, base pair-mismatch assay (Mismatch Detect II kit, Ambion)와 MTT assay를 시행하였다.

**결과 :** RNA/RNA mismatch assay에서는 rifampin-내성 결핵균주 15균주 중 13균주가 내성, 감수성균주 11균주 중 10균주가 감수성을 보여 민감도 87%, 특이도 91%를 보였고, MTT assay에서는 rifampin-내성 결핵균주 15균주 중 10균주가 내성, 감수성균주 11균주 중 7균주가 감수성을 보여 민감도 67%, 특이도 73%를 보였다. 내성 균주 5%와 감수성균주 95%를 혼합한 검체에서는 내성으로 나타났다.

**결론 :** Rifampin-내성 결핵의 신속하고 정확한 진단을 위해 시행한 본 연구에서 MTT assay는 값싸고 간단하기는 하나 민감도, 특이도가 낮았으며, RNA/RNA duplex, base-pair-mismatch assay는 임상에서 rifampin-내성 결핵의 진단에 유용한 방법임을 보여 주었다.

## 참고문헌

- 1) 류우진 : 한국의 결핵현황과 전망. 대한결핵협회 보고, 1999
- 2) 심영수. 난치성 폐결핵 치료의 최신 지견. 결핵연구소 연구보고 8:13-22, 1997
- 3) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T : Detection of rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341:674-650, 1993
- 4) Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswirth BN, Musser JM : Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpo β*) encoding the RNA polymerase  $\beta$  subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York and Texas. *J Clin Microbiol* 32:1095-1098, 1994
- 5) Nash KA : Gaytan A. Inderlied CB. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by use of a rapid, simple, and specific RNA/RNA mismatch assay. *J Infect Dis* 176:533-536, 1997
- 6) Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miorner H : Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 36:1214-1219, 1998
- 7) Heym B, Alzari PM, Honore N, Cole ST : Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 15:235-245, 1995
- 8) Wilson TM, de Lisle GW, Collins DM : Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol* 15:1009-1015,

1995

- 9) Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH: *Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB)*. *J Clin Microbiol* 37:1714-1720, 1999
- 10) Simon AW, Stuart MW, Malcolm DY, Francis AD: *Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 36:1969-1973, 1998
- 11) Temesgen Z, Satoh K, Uhl JR, Kline BC, Cockerill FR 3rd: *Use of polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis to detect a point mutation in the catalase-peroxidase gene (katG) of Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes* 11:59-63, 1997
- 12) Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT: *Evaluation of a line probe assay kit for characterization of rpo  $\beta$  mutations in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from New York City*. *J Clin Microbiol* 35:1281-1283, 1997