

석사학위논문

국내 환자에서 분리된 다제내성
결핵균 및 폐 외 결핵환자에서
결핵균 *pncA* 유전자 분석

제주대학교 대학원

의 학 과

김 형 준

2010년 2월

석사학위논문

국내 환자에서 분리된 다제내성
결핵균 및 폐 외 결핵환자에서
결핵균 *pncA* 유전자 분석

제주대학교 대학원

1952

의 학 과

김 형 준

2010년 2월

국내 환자에서 분리된 다제 내성 결핵균 및 폐외
결핵환자에서 결핵균 *pncA* 유전자 분석

지도교수 이 근 화

김 형 준

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 2월

김형준의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 印

위 원 _____ 印

위 원 _____ 印

제주대학교 대학원

2010년 2월

The *pncA* genetic analysis of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates and Extrapulmonary Tuberculosis patients in Korea

Hyung-Jun Kim

(Supervised by Professor **Keun-Hwa Lee**)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for degree of Master of Science in Medicine

2010. 2.

This thesis has been examined and approved.

Department of Medicine

Graduate School

Jeju National University

ABSTRACT

피라진아마이드(Pyrazinamide, 이하 PZA)는 결핵환자의 치료에 중요한 1차 항결핵제이다. 그러나 다른 1차 항결핵제와 마찬가지로 PZA에 대한 내성균이 존재한다. PZA는 프로드러그(Prodrug)으로 활성(activity)을 가지기 위해서는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)내 존재하는 *pncA* 유전자가 암호화 하는 피라진아미데이즈(Pyrazinamidase, 이하 PZase)에 의한 pyrazinoic acid로의 전환이 반드시 필요하다. 따라서 PZA에 대한 내성이 있는 *M. tuberculosis*의 경우에는 *pncA* 유전자내의 돌연변이(Mutation)가 있는지를 확인하여야 한다. 따라서 한국에서 분리된 다제내성결핵균(MDR-TB) 및 폐외결핵 환자(Extrapulmonary Tuberculosis Patients) 조직에서 분리한 DNA를 대상으로 유전자 수준에서 PZA내성을 조사하기 위해 PZase의 유전자(*pncA*)를 분석했다. 치환(substitution), 결실(deletion), 삽입 (insertion), 다지역 돌연변이 (multi-site mutation)가 *pncA* 유전자 내에서 발견되었으며 그 빈도는 PZA저항성과는 관계없이 다제 내성 결핵균에서 돌연변이 빈도가 높았다. 특히 169번째 뉴클레오타이드가 C에서 G로 바뀐 점 돌연변이(point mutation)가 폐외결핵 환자(Extrapulmonary Tuberculosis Patients)조직에서 분리한 DNA에서 발견되었다. 169번째 뉴클레오타이드(nucleotide)가 사이토신(cytosine)에서 구아닌(guanine)으로 바뀐 점 돌연변이는 Bacilli Calmette-Guerin (BCG)나 *M.bovis*에서만 나타나며 *M.tuberculosis*에서는 발견되지 않는다. 이러한 연구결과는 결핵의 예방을 위해 접종하는 BCG 백신(vaccine)의 재활성(reactivation) 되었음을 보여주는 결과로

한국에서 지금까지 보고되지 않은 약독화 생백신 BCG가 재활성 되었음을 보여주는 결과이다. 또한 *M.bovis*, BCG의 경우 169번째의 변이로 PZA에 대해서 선천적으로 내성을 보인다. 따라서 *M.tuberculosis*에 의한 결핵과 BCG의 재활성에 의한 결핵에 대해서 구별하여 치료 약제를 선택하여야 함을 보여주는 결과이다.

Key word: *Mycobacterium tuberculosis*, pyrazinamide, *pncA*, BCG, 폐결핵, 폐외결핵, 다제내성 결핵(MDR-TB), 광범위내성 결핵(XDR-TB)



목 차

ABSTRACT	i
목 차	iii
LIST OF SCHEME	iv
LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vi
1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	4
2-1. 임상분리 결핵균 및 폐외결핵 환자 조직 DNA	
2-2. <i>pncA</i> 유전자 증폭	
2-3. <i>pncA</i> 유전자 염기서열 분석	
2-4. PZA 약제 감수성 검사	
3. 결 과	7
3-1. 폐결핵 환자에서 분리한 결핵균에서 <i>pncA</i> 유전자 돌연변이 분석 결과	
3-2. 결핵균에서의 <i>pncA</i> 유전자 돌연변이 종류와 빈도	
3-3. 폐외결핵 환자 조직 DNA에서 <i>pncA</i> 유전자 변이 분석결과	
4. 고 찰	22
5. 참 고 문 헌	24

LIST OF SCHEME

Scheme 1. 환자 검체에서 분리된 결핵균 *pncA* 유전자 염기서열 분석 모식도
..... 5



LIST OF TABLES

Table 1. *pncA* sequences of *M.tuberculosis* from South Korean 10

Table 2. *pncA* sequences of multidrug-resistant tuberculosis of pulmonary TB from South Korean 12

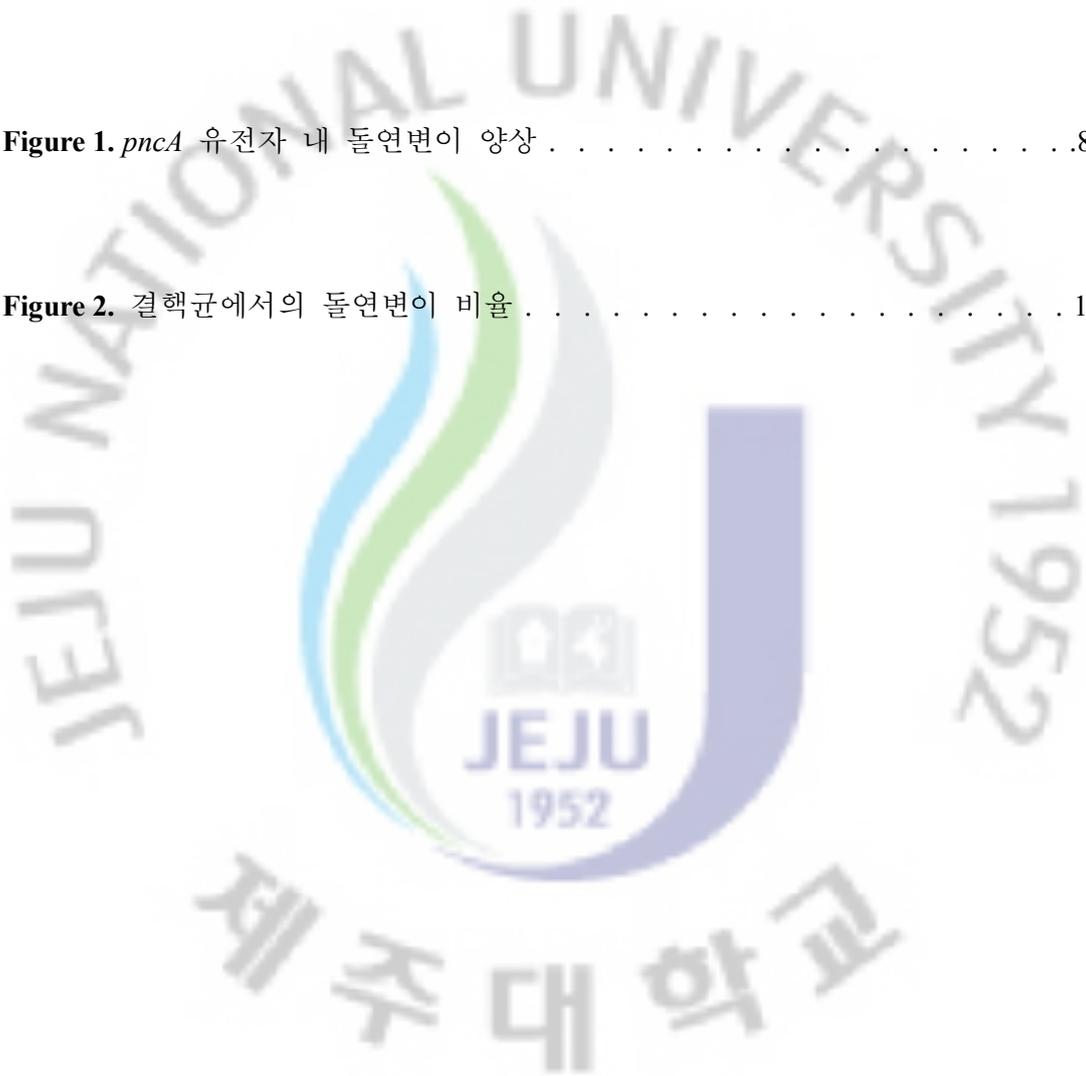
Table 3. *pncA* sequences of extensively drug-resistant tuberculosis of pulmonary TB from South Korean 16

Table 4. *pncA* sequences of *M.tuberculosis* of extra-pulmonary TB from South Korean 20

LIST OF FIGURES

Figure 1. *pncA* 유전자 내 돌연변이 양상 8

Figure 2. 결핵균에서의 돌연변이 비율 18



I. 서 론

결핵(tuberculosis)이란 호흡기를 통한 *M.tuberculosis*의 감염으로 인해 일어나는 질병으로 폐에 감염되어 1차적으로 폐결핵(Pulmonary tuberculosis)을 일으킨다. 폐결핵의 결핵균이 폐 외 조직으로 전이되어 감염을 일으키기도 하며 이 경우를 폐외결핵(Extrapulmonary tuberculosis)이라 한다.

*M.tuberculosis*는 절대 산소성 균(obligate aerobes)으로 산소 분압이 낮은 조직보다는 폐상엽, 신장, 뇌, 골수와 같이 산소의 공급이 많은 부위에 병터를 형성한다. 그러나 건조, 산, 알칼리 및 암모니아 화합물에 대하여 일반 세균에 비해 내성이 강해 산소가 결핍된 피사 병터에서도 모든 산화활성이 억제된 휴면균(dormant bacilli)으로 수년간 생존 가능하다. 건조 객담 내에서도 6~8개월 동안 생존이 가능하며[1] 호흡기를 통해 전파되는 특성 때문에 전 세계 인구의 3분의 1이 감염되어 있을 정도로 공중보건학적으로 위협이 되는 미생물로 매년 팔백팔십만 명의 새로운 감염환자와 백오십만 명의 사망자가 발생하고 있다[2].

표준균주인 *M.tuberculosis* H37Rv의 전체 유전체는 4,411,529 염기쌍으로 구성되어 있으며 단백질을 부호화하는 약 4,000개의 유전자를 포함한다. 이 중 40%는 정확한 기능이 밝혀졌고, 44%는 유사한 기능을, 그리고 나머지 16%는 기능을 알 수 없으나 결핵균의 특정기능을 담당할 것으로 예측하고 있다[1]. 1996년 밝혀진 *pncA* 유전자는 561개의 염기쌍으로 구성되어 있으며 1차 항결핵제 중 하나인 pyrazinamide를 pyrazinoic acid 형태로 변환하는 효소인 PZase(20.89kDa) 를 암호화하는 것으로 알려졌다[7].

세계보건기구(World Health Organization 이하 WHO)에서는 *M.bovis*를 약독화시켜 만든 생백신인 BCG의 접종을 통한 예방을 권유하고 있다. 그러나 BCG 백신의 재활성에 의한 발병도 보고되고 있어[39,40] 미국을 포함한 선진국에서는 BCG

접종을 실시하지 않는다[1].

결핵의 치료는 결핵균의 성장속도가 매우 느릴 뿐 아니라 육아종 속이나 면역세포 속에 숨어 있거나 10^6 세포분열마다 한 개의 돌연변이주가 출현하므로[1] 여러 종류의 항결핵제를 지속적이며 장기간 투약하는 것을 원칙으로 하며 1차 항결핵제로는 아이나(Isoniazid, INH), 리팜핀(Rifampin, RMP), 에탐부톨(Ethambutol, EMB), 피라진아마이드(Pyrazinamide, PZA)등이 있다. 이 때 잘못된 처방, 약제의 불량, 임의적인 투약은 복용중인 1차 항결핵제에 대해 내성을 일으켜 다제내성결핵(Multidrug-resistant tuberculosis, 이하 MDR-TB), 다시 내성을 일으킬 경우 광범위내성결핵(Extensively drug-resistant tuberculosis, 이하 XDR-TB)로 심화된다. WHO가 2006년 10월 제네바 모임에서 정의한 기준에 따라 isoniazid, rifampin에 내성을 보이는 경우를 MDR-TB, MDR-TB의 조건을 만족시키면서 fluoroquinolone 중 최소 1가지, amikacin, kanamycin, capreomycin 중 최소 1가지에 동시에 내성을 갖는 경우를 XDR-TB라 정의한다.

1994년을 시작으로 1997년까지, 35개국을 대상으로 한 항결핵제 내성환자를 조사한 결과 35개국 전체에서 내성환자를 발견하였으며[1] 한국에서도 새로운 결핵환자에서의 MDR-TB 비율은 1994년을 시작으로 2003년에 이르기까지 1.6%에서 2.4%로 점점 증가 추세에 있어[3] 일반적인 결핵환자뿐만 아니라 MDR-TB 환자 치료에도 쓰이는 PZA에 대한 내성빈도 연구가 필요하다고 보고 연구를 시작하였다.

PZA는 산성환경에서 반휴지기 상태에 있는 결핵균을 제거하는 항결핵제로 다른 항결핵제와 같이 처방할 경우 1년여의 치료기간을 반으로 줄여 줄 수 있다. PZA는 프로드러그로 결핵균에 영향을 미치기 위해서는 균의 PZase에 의해 활성형태인 pyrazinoic acid로의 변환이 필수적이다. 따라서 PZase를 암호화하는 *pncA*에서의 돌연변이는 PZA내성의 주요 원인이며 PZase 활성화와 결핵균의 PZA내성과의 연관성에 관해 보고 된 바 있다[7,8]. 따라서 본 연구에서는 한국에서 임상 분리된

*M.tuberculosis*에서 유전적 수준에 기초하여 PZA 내성을 결정하기 위해 *pncA* 유전자를 분석하였다. PZA에 대한 감수성을 결정하기 위해서는 PZA를 함유한 배지에서의 MIC (Minimum inhibitory concentration)에 따른 균의 성장여부를 판단하는 것이 일반적이나[4] pyrazinamidase는 산성(pH 5.5) 환경에서만 활성을 보이고 결핵균은 이 정도의 산성배지에서는 잘 자라지 못하므로 고체배지를 이용한 감수성검사로 pyrazinamide 내성여부를 판정하는데 어려움이 있어 한국의 경우 결핵균의 pyrazinamide 내성여부를 균의 PZase 활성을 조사하여 결정하기도 한다. [5,6] 그러나 배양을 기본으로 하는 PZA 내성 검사법은 최고 3개월의 시간이 필요하며 검사법의 성공률이 높지 않은 것으로 알려져 있다[17].

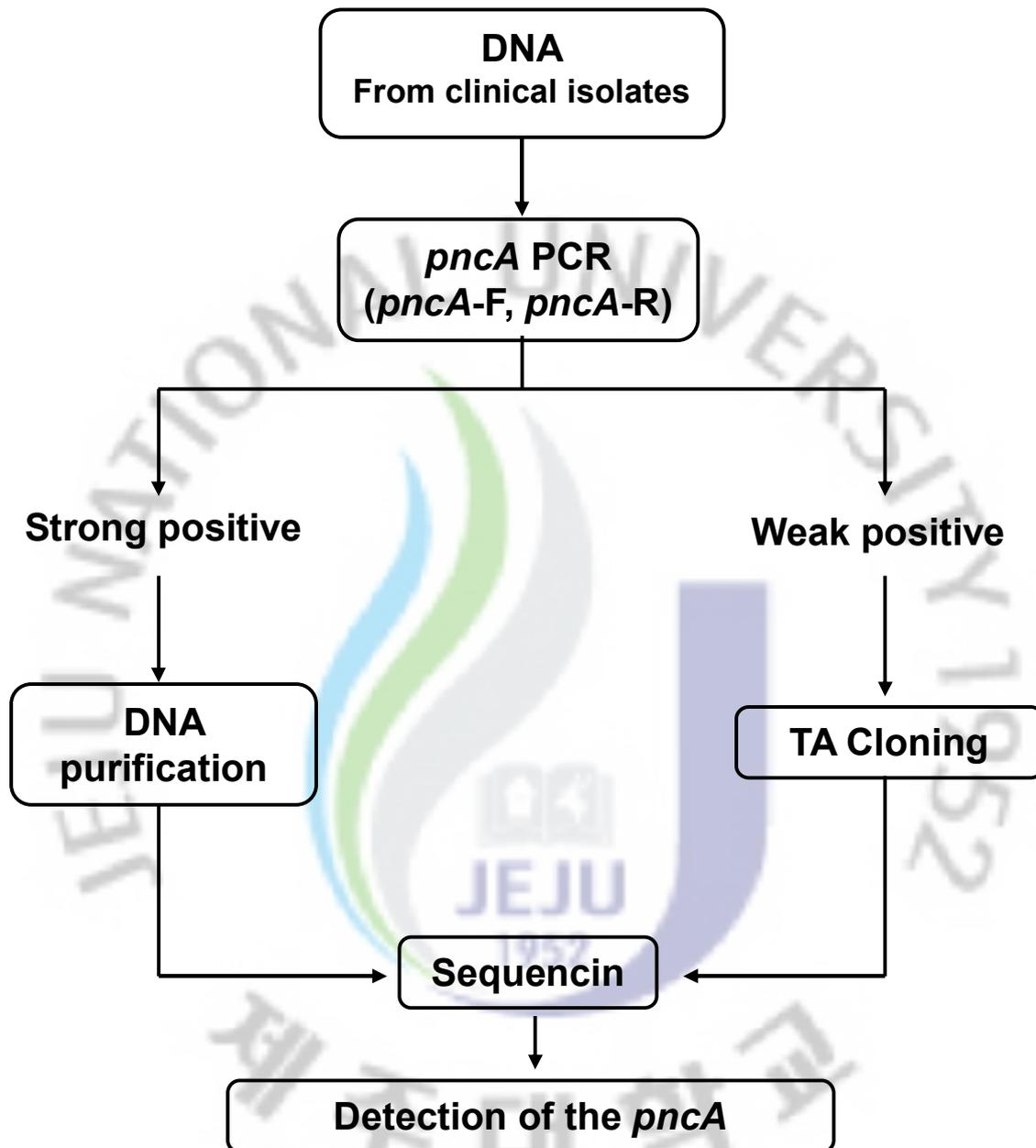
II. 재료 및 방법

2-1. 임상분리 결핵균 및 폐외결핵 환자 조직 DNA

결핵균 및 결핵환자로 진단된 총 168개의 임상 분리 결핵균 및 폐외결핵 조직 DNA를 마산 국제결핵연구센터, 서울대학교병원, 제주대학교병원 진단검사의학실에서 제공받았다. 이 중 139개의 임상분리 결핵균 DNA가 폐결핵(37개 TB, 83개 MDR-TB, 19개 XDR-TB)이었으며 나머지 29개는 폐외결핵 환자 조직에서 분리한 DNA이다. *pncA*에서의 돌연변이는 PCR sequencing이나 PCR-plasmid TA cloning-sequencing을 통해 얻어낸 염기서열을 PZA 감수성이며 표준균주인 H37Rv(ATCC25618)과 비교하여 확인하였다[8].

2-2. *pncA* 유전자 증폭

pncA 유전자의 증폭은 Thermocycler(GeneAmp PCR system 9600, PerkinElmer, Foster City, CA)를 이용 아래의 *pncA* 유전자 증폭 프라이머(primer)를 이용하여 증폭하였으며 증폭 후 670bp 크기의 밴드를 얻을 수 있었다. 반응 cycle은 다음과 같다: 95°C 5분, 이하 94°C 45초, 60°C 45초, 72°C 60초, 40회, 72°C 10분 실행하였으며 사용된 primer는 *pncA*-F (5'-GGCGTCATGGACCCTATATC-3'), *pncA*-R (5'-CAACAGTTCATCCCGGTTTC-3')이다. *pncA* PCR 이 후에는 QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN, Germany)로 정제한 후 필요에 따라 cloning(TOPO TA, Invitrogen, Carlsbad, CA)을 하거나 혹은 바로 BigDye Terminator cycle sequencing kit과 AmpliTaq DNA polymerase를 이용해 sequencing 반응을 시켰다(Scheme 1).



Scheme 1. 환자 검체에서 분리된 결핵균 *pncA* 유전자 염기서열 분석 모식도

2-3. *pncA* 유전자 염기서열 분석

pncA 유전자 염기서열은 BioEdit software(version 5.0.9.1; T. A. Hall Software, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA), CHROMAS version 2.33, and BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 을 이용해 분석하였다.

2-4. PZA 약제 감수성 검사

환자의 객담에서 분리한 모든 결핵균은 분리된 후 바로 PZA 내성판단 과정을 거치거나 필요에 따라 배양하였으며 배양된 결핵균은 37°C 3~4주간 Löwenstein-Jensen medium에서 배양되었다. PZA내성 여부는 PZA 감수성 검사법과 pyrazinamidase assay(Wayne`s method)를 통해 판단하였다. PZA 감수성 검사의 경우 pH 5.6의 Löwenstein-Jensen 배지에서 100µg/ml의 PZA농도로 실시되었다 [26].

III. 결 과

약제에 대해서 감수성 및 다양한 내성 상태를 보이는 총 168개 결핵균 및 폐외결핵 조직 DNA에서 *pncA* 유전자 내 돌연변이를 살펴본 결과 매우 다양한 형태를 보여주었다(figure 1).

같은 돌연변이를 갖는 경우는 매우 적었으며(최대 11개) 돌연변이가 일어나는 지역도 Promoter 지역을 포함해서 여러 지역에서 일어났다. 이러한 *pncA* 유전자의 변이는 돌연변이가 제한적으로 일어나는 rifampin, streptomycin, kanamycin, ethambutol, quinolone 내성인 경우에 비해 다른 특징을 가짐을 보여주는 결과이다[26]. 이러한 다양한 돌연변이를 가지는 이유에 대해서는 adaptive mutagenesis이거나 DNA mismatch 수선 기작의 결여, *pncA* 지역 자체의 성질, 발현되지 않은 돌연변이의 누적과 같은 가설이 제시되고 있으나 아직 명확히 밝혀지지 않았다[26].

GG	CGT	CAT	GGA	CCC	TAT	ATC	TGT	GGC	TGC	CGC	GTC
GGT	AGG	CAA	ACT	GCC	CGG	GCA	GTC	GCC	CGA	ACG	TAT
GGT	GGA	CGT	ATG	CGG	GCG	TGG	ATC	ATC	GTC	GAC	GTG
CAG	AAC	GAC	TTC	TGC	GAG	GGT	GGC	TCG	CTG	GCG	GTA
ACC	GGT	GGC	GCC	GCG	CTG	GCC	CGC	GCC	ATC	AGC	GAC
TAC	CTG	GCC	GAA	GCG	GCG	GAC	TAC	CAT	CAC	GTC	GTG
GCA	ACC	AAG	GAC	TTC	CAC	ATC	GAC	CCG	GGT	GAC	CAC
TTC	TCC	GGC	ACA	CCG	GAC	TAT	TCC	TCG	TCG	TGG	CCA
CCG	CAT	TGC	GTC	AGC	GGT	ACT	CCC	GGC	GCG	GAC	TTC
CAT	CCC	AGT	CTG	GAC	ACG	TCG	GCA	ATC	GAG	GCG	GTG
TTC	TAC	AAG	GGT	GCC	TAC	ACC	GGA	GCG	TAC	AGC	GGC
TTC	GAA	GGA	GTC	GAC	GAG	AAC	GGC	ACG	CCA	CTG	CTG
AAT	TGG	CTG	CGG	CAA	CGC	GGC	GTC	GAT	GAG	GTC	GAT
GTG	GTC	GGT	ATT	GCC	ACC	GAT	CAT	TGT	GTG	CGC	CAG
ACG	GCC	GAG	GAC	GCG	GTA	CGC	AAT	GGC	TTG	GCC	ACC
AGG	GTG	CTG	GTG	GAC	CTG	ACA	GCG	GGT	GTG	TCG	GCC
GAT	ACC	ACC	GTC	GCC	GCG	CTG	GAG	GAG	ATG	CGC	ACC
GCC	AGC	GTC	GAG	TTG	GTT	TGC	AGC	TCC	TGA	TGG	CAC
CGC	CGA	ACC	GGG	ATG	AAC	TGT	TG				

Figure 1. *pncA* 유전자 내 돌연변이 양상. 돌연변이 지역을 색을 칠해 표시하였다. 돌연변이 허용범위가 제한적인 다른 약제 내성 돌연변이에 비해 매우 다양한 지역에 돌연변이가 존재함을 알 수 있다. (굵은 글씨체: primer지역, ■ : TB, ■ : MDR-TB, ■ : XDR-TB, ■ : TB, MDR-TB 공통, ■ : MDR-TB, XDR-TB 공통)

3-1. 폐결핵 환자에서 분리한 결핵균에서 *pncA* 유전자 돌연변이 분석 결과

약제 감수성 결핵균 DNA 총 37개중 13개(35.1%)가 돌연변이를 가지고 있었으며 10개(27%)가 치환, 2개(5.4%)가 결실, 1개(2.7%)가 치환과 결실을 동시에 가지고 있었다. PZA 감수성 검사는 아쉽게도 모두 실패하였다. 일어난 돌연변이에 대해서 좀 더 살펴보면 2개(5.4%)는 아미노산상에 변화가 없는 잠재성 돌연변이(silence mutation)였으며 1개(2.7%)는 변화된 서열이 종료 코돈을 암호화하여 PZase활성이 없는 폴리펩타이드가 생성되는 돌연변이였다[8]. 3개(8.1%) 샘플에서 다지역 치환 돌연변이가 발생하였고 2개(5.4%)에서 결실로 인한 프레임시프트 돌연변이(frame shift mutation), 그리고 1개(2.7%)에서 치환과 결실이 동시에 발견되었다. 그리고 4개의 미보고 돌연변이가 발견되었다(Table 1).

Table 1. *pncA* sequences of *M. tuberculosis* from South Korean (total 37)

Nucleotide change(s) (nucleotide no.)	Amino acid change(s) (codon no.) ^a	% ^b (No.) of isolates	Susceptibility to PZA ^c	Diagnosis/Clinical specimens	Remarks
GAC>GAT (147)	Asp (49) >Asp	2.7 (1)	NA ^d	pulmonary TB/Sputum	Substitution (no amino acid change)
GGT>GGC (396)	Gly (132) >Gly	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution (no amino acid change)
GCG>GTG (29)	Ala (10) >Val	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution
GTG>TTG (388)	Val (130) >Leu	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Pleural	Substitution
GAT>AAT (376)	Asp (126) >Asn	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Bronchial wash	Substitution
AAT>ATT (446)	Asn (149) >Ile	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution
GCC>GCT (429); CCC>CCA (231); TTG>TCG (35); TGG>AGG (355); CCA>CCG (345)	Ala (143) >Ala; Pro (77) >Pro; Leu (12) >Ser; Trp (119) >Arg; Pro (115) >Pro ^f	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution at multiple sites
GAA>AAA (109); GGA>AGA (301); GCG>GCA (483); GTC>GAC (392)	Glu (37) >Lys; Gly (101) >Arg; Ala (161) >Ala; Val (131) >Asp ^f	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution at multiple sites
TCG>CCG (52); GTC>GCC (218)	Ser (18) >Pro; Val (73) >Ala ^f	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution at multiple sites
CCG>CCA (162); CCC>CC_ (249)	Pro (54) >Pro; Frameshift ^f	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Pleural	Substitution and deletion
CCA > C_A (206)	Frameshift	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	deletion at 206
CCG>C_G (185)	Frameshift	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	deletion at 185
TGG>TGA (357)	Trp (119) >Stop	2.7 (1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution (termination)
Wt ^e	Wt	64.9 (24)	NA	pulmonary TB/Sputum	

^aNumber of codon position was counted from the start codon (ATG) of the *pncA*

^bPercentage calculated based on non-multidrug category

^cS, sensitive; R, resistant

^dNA, not available; ^ewt, wild type

^fNew mutation not reported in previous studies

MDR-TB에서는 총 83개 샘플에서 단지 12개만이 야생형(Wild type)이었으며 71개(85.2%) 샘플이 돌연변이를 가지고 있었다. 돌연변이의 유형 및 빈도를 살펴보면 치환이 39개(46.8%), 결실이 10개(12%), 삽입이 9개(10.8%), 그리고 여러 지역에서 다양한 돌연변이가 발생한 다지역 돌연변이가 13개(15.6%)였다.

PZA 감수성 검사 결과 71개(85.2%)가 돌연변이를 갖는데 비해 61개(73.2%)만이 PZA 내성을 갖는 것으로 나왔으나 14개(16.8%)가 PZA 감수성 검사를 실패해 내성율과 돌연변이 비율 사이의 관계를 명확히 따질 수 없었다. 약제 감수성인 결핵균에서와 마찬가지로 치환이 다수를 차지하였으며 시작 코돈(start codon)으로부터 -11bp에서 일어난 치환 돌연변이가 가장 많이 발견된 돌연변이로 총 7개(8.4%) 샘플에서 찾을 수 있었다. 3개(3.6%) 샘플에서 종결 코돈(stop codon)을 암호화하는 돌연변이가 일어났으며[8] 몇몇 샘플의 결실 돌연변이에서는 약제 감수성인 결핵균에서와는 다르게 여러 개의 뉴클레오타이드가 결실되는 특징을 가지고 있었다. 또한 29개의 미보고 돌연변이를 본 연구에서 발견하였다(Table 2).

MDR-TB DNA중 1개(1.2%)는 *pncA* 유전자 내 변이가 발견되지 않았지만 PZA약제 감수성 검사 결과 PZA에 대해 내성을 가지는 경우였다. 이는 PZase의 발현과 관계없이 PZA내성을 위한 대체적인 경로(alternative pathway)가 존재함을 보여주는 결과로서[9], 문헌고찰 결과 Pyrazinoic acid의 목표물 자체의 변이 혹은 균 자체의 Pyrazinoic acid 유출능력 상승과 같은 가설이 제시되고는 있으나 아직까지 명확히 밝혀진 바 없다[26].

Table 2. *pncA* sequences of multidrug-resistant tuberculosis of pulmonary TB from South Korean (total 83)

Nucleotide change(s) (nucleotide no.)	Amino acid change(s) (codon no.) ^a	% ^b (No.) of isolates	Susceptibility to PZA ^c	Diagnosis/Clinical specimens	Remarks
Substitution					
TAT>TGT (-11)	Tyr(-4)>Cys	8.4(7)	R	cultured	Substitution
TTG>TCG (11)	Leu(4)>Ser	1.2(1)	R	cultured	Substitution
TTG>TGG (11)	Leu(4)>Trp	1.2(1)	R	cultured	Substitution
GTC>GGC (20)	Val(7)>Gly	1.2(1)	R	cultured	Substitution
CAG>CCG (29)	Gln(10)>Pro	1.2(1)	R	cultured	Substitution
GAC>GCC (35)	Asp (12) >Ala	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution
TGC>CGC (40)	Cys(14)>Arg	1.2(1)	R	cultured	Substitution
GAC>GCC (146)	Asp (49) >Ala	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution
CAC>TAC (151)	His (51) >Tyr	1.2(1)	R	pulmonary TB/Sputum	Substitution
CAC>CCC (152)	His(51)>Pro	1.2(1)	R	cultured	Substitution
CCG>CTG (161)	Pro(54)>Leu	2.4(2)	R	cultured	Substitution
TCG>CCG (198)	Ser(67)>Pro ^f	2.4(2)	R	cultured	Substitution
TGG>CGG (202)	Trp(68)>Arg	1.2(1)	R	cultured	Substitution
TGG>TCG (203)	Trp (68) >Ser	1.2(1)	R	pulmonary TB/Sputum	Substitution
TTC>TTG (282)	Phe(94)>Leu ^f	1.2(1)	R	cultured	Substitution
GGT>GAT (290)	Gly(97)>Asp	1.2(1)	R	cultured	Substitution
TAC>GAC (295)	Tyr (99) >Asp	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution
TAC>CAC (307)	Tyr(103)>His	1.2(1)	R	cultured	Substitution
GTG>GCG (389)	Val(130)>Ala ^f	1.2(1)	R	cultured	Substitution
ACC>CCC (403)	Thr(135)>Pro	3.6(3)	R	cultured	Substitution
GAT>AAT (406)	Asp (136) >Asn	1.2(1)	S	pulmonary TB/Sputum	Substitution
CAG>CCG (422)	Gln (141) >Pro	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution
GCG>GTG (437)	Ala(146)>Val	2.4(2)	R	cultured	Substitution
AGG>GGG (460)	Arg(154)>Gly	1.2(1)	R	cultured	Substitution
GCG>GAG (512)	Ala(171)>Glu ^f	1.2(1)	R	cultured	Substitution
GAG>TAG (271)	Glu (91) >Stop	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Substitution (termination)
TAC>TAA (309)	Tyr(103)>stop	1.2(1)	R	cultured	Substitution(termination)
CAG>TAG (421)	Gln(141)>Stop	1.2(1)	R	cultured	Substitution(termination)

(continued)

Table 2. (continued)

Nucleotide change(s) (nucleotide no.)	Amino acid change(s) (codon no.) ^a	% ^b (No.) of isolates	Susceptibility to PZA ^c	Diagnosis/Clinical specimens	Remarks
Deletion					
GGA>G_A (-71)	frameshift ^f	3.6(3)	R	cultured	deletion at -71
80bp deletion (-11)	frameshift ^f	2.4(2)	R	cultured	deletion from -11 to 78
GCA>___, ACC>___ (136-141)	loss of 2 exact amino acid (46, 47) ^f	1.2(1)	S	pulmonary TB/Sputum	deletion at 136 to 141
GTC>GT_ (393)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at 393
10bp deletion (454)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion from 454 to 463
CTG>_TG (514)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at 514
TAC>___, AGC>_C (307-311)	Frameshift	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	deletion at 307 to 311
Insertion					
GGT>CGG (67)	frameshift ^f	2.4(2)	R	cultured	insertion at 67
5bp insertion(80)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	insertion at 80
GTC>GTA (132)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	insertion at 132
GAT>GAA (408)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	insertion at 408
GTG>GTT (489)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	insertion at 489
4bp insertion (80)	Frameshift	1.2(1)	S	pulmonary TB/Sputum	insertion at 80
ACA>AAC (182)	Frameshift	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	Insertion at 182
ACC>CAC (403)	Frameshift	1.2(1)	S	pulmonary TB/Sputum	insertion at 403
Wild type					
Wt ^e	Wt	1.2(1)	R	pulmonary TB/Sputum	
Wt	Wt	1.2(1)	NA	pulmonary TB/Sputum	
Wt	Wt	12(10)	S	pulmonary TB/Sputum	

(continued)

Table 2. (continued)

Nucleotide change(s) (nucleotide no.)	Amino acid change(s) (codon no.) ^a	% ^b (No.) of isolates	Susceptibility to PZA ^c	Diagnosis/Clinical specimens	Remarks
Multi-site mutation					
GGA>G_A (-71); GCG>ACG (58); GCC>ACC (400)	frameshift; Ala(20)>Thr; Ala(134)>Thr ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; substitution
GGA>G_A (-71); ACT>CCT (226)	frameshift; Thr(76)>Pro ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; substitution
GGA>G_A (-71); ACC>CCC (403)	frameshift; Thr(135)>Pro ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; substitution
GGA>G_A (-71); ACA>CCA (478); TTG>T__ (545-546)	frameshift; Thr(160)>Pro ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; substitution; deletion at 545,546
GGA>G_A (-71); ACC>CCC (298)	frameshift; Thr(100)>Pro ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; substitution
GGA>G_A (-71); 4bp insertion (537)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; insertion at 537
GGA>G_A (-71); AAT>ATA (446); TTG>T_G (453); GCC>GCA (457); ACC>CCC (458); TTG>T__ (545-546)	frameshift; Ala(152)>Ala; Thr(153)>Pro ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; deletion at 151; insertion at 446; substitution at 457; deletion at 545,546
GGA>G_A (-71); 9bp deletion (382)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion at -71; deletion from 382 to 390
TAT>TGT (-11); TTG>T__ (545-546)	Tyr(-4)>Cys ^f	1.2(1)	R	cultured	substitution; deletion at 545,546
GTG>GAG (134); 4bp insertion (537)	Val(45)>Glu; frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	substitution; insertion at 537
GCA>GAA (137); TTG>T__ (545-546)	Ala(46)>Glu; frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	substitution; deletion at 545,546
9bp deletion (385); 4bp insertion (537); TTG>T__ (545-546)	frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	deletion from 385 to 393; insertion at 537; deletion at 545,546
CAG>CCG (422); 4bp insertion (537)	Gln(141)>Pro; frameshift ^f	1.2(1)	R	cultured	substitution; insertion at 537

^a Number of codon position was counted from the start codon (ATG) of the *pncA*^b Percentage calculated based on MDR pulmonary TB category^c S, sensitive; R, resistant^d NA, not available; ^ewt, wild type^f New mutation not reported in previous studies

XDR-TB에서는 총 19개 모두가 돌연변이를 가지고 있었으며 치환이 13개(68.4%), 결실이 2개(10.4%), 삽입이 1개(5.2%) 그리고 다지역 돌연변이가 3개(15.6%) 이었다. XDR-TB 모두가 PZA에 대한 내성을 가지고 있었으며 최다 빈도수를 기록한 돌연변이는 403번째 뉴클레오타이드에서의 치환 돌연변이로 총 6개(31.2%)에서 발견되었다. -71bp에서의 결실 돌연변이는 11개(13.2%)의 MDR-TB에서도 발견되는 돌연변이였으며 총 10개의 미보고 돌연변이를 본 연구에서 발견하였다(Table 3).



Table 3. *pncA* sequences of extensively drug-resistant tuberculosis of pulmonary from South Korean (total 19)

Nucleotide change(s) (nucleotide no.)	Amino acid change(s) (codon no.) ^a	% ^b (No.) of isolates	Susceptibility to PZA ^c	Diagnosis/Clinical specimens	Remarks
single-site mutation					
GGA>G_A (-71)	frameshift ^f	5(1)	R	cultured	deletion at -71
GTG>GAG (134)	Val(45)>Glu ^f	5(1)	R	cultured	Substitution
AAG>GAG (142)	Lys(48)>Glu ^f	5(1)	R	cultured	Substitution
AGC>AGA (312)	Ser(104)>Arg ^f	5(1)	R	cultured	Substitution
GTG>GGG (470)	Val(157)>Gly ^f	5(1)	R	cultured	Substitution
CAT>___ (211-213)	frameshift ^f	5(1)	R	cultured	deletion at 211,212,213
4bp insertion (537)	frameshift ^f	5(1)	R	cultured	insertion at 537
ACC>CCC (403)	Thr(135)>Pro	30(6)	R	cultured	Substitution
TGG>TCG (203)	Trp(68)>Ser	5(1)	R	cultured	Substitution
CTG>CGG (347)	Leu(116)>Arg	10(2)	R	cultured	Substitution
multi-site mutation					
CTG>CGG (347), 4bp insertion (537)	Leu(116)>Arg, frameshift ^f	5(1)	R	cultured	Substitution, insertion at 537
ACC>CCC (403), 4bp insertion (537)	Thr(135)>Pro, frameshift ^f	5(1)	R	cultured	Substitution, insertion at 537
GTG>GGG (470), TTG>T__ (545-546)	Val(157)>Gly, frameshift ^f	5(1)	R	cultured	Substitution, deletion at 545,546

^a Number of codon position was counted from the start codon (ATG) of the *pncA*

^b Percentage calculated based on XDR pulmonary TB category

^c S, sensitive; R, resistant

^d NA, not available; ^e wt, wild type

^f New mutation not reported in previous studies

3-2. 결핵균에서의 *pncA* 유전자 돌연변이 종류와 빈도

결핵균 DNA에서의 *pncA* 유전자 돌연변이는 *M.tuberculosis*, MDR-TB, XDR-TB에서 35.1%(13/37), 85.5%(71/83), 100%(19/19)로 약제 내성이 심해질수록 *pncA*에서의 돌연변이 빈도도 높아지는 것으로 관찰되었다. 돌연변이의 비율은 내성의 정도와는 관계없이 치환 돌연변이가 다수를 차지해 결핵균에서의 돌연변이 중 44.6%를 차지하였고 나머지 돌연변이의 비율은 10% 내외(결실 10%, 삽입 7.2%, 다지역 12.2%)로 비슷했다(figure 2). 다만 약제 감수성 결핵균보다 내성이 존재할 때 하나의 결핵균내 존재하는 돌연변이 빈도가 잦았으며 그 범위도 컸다.



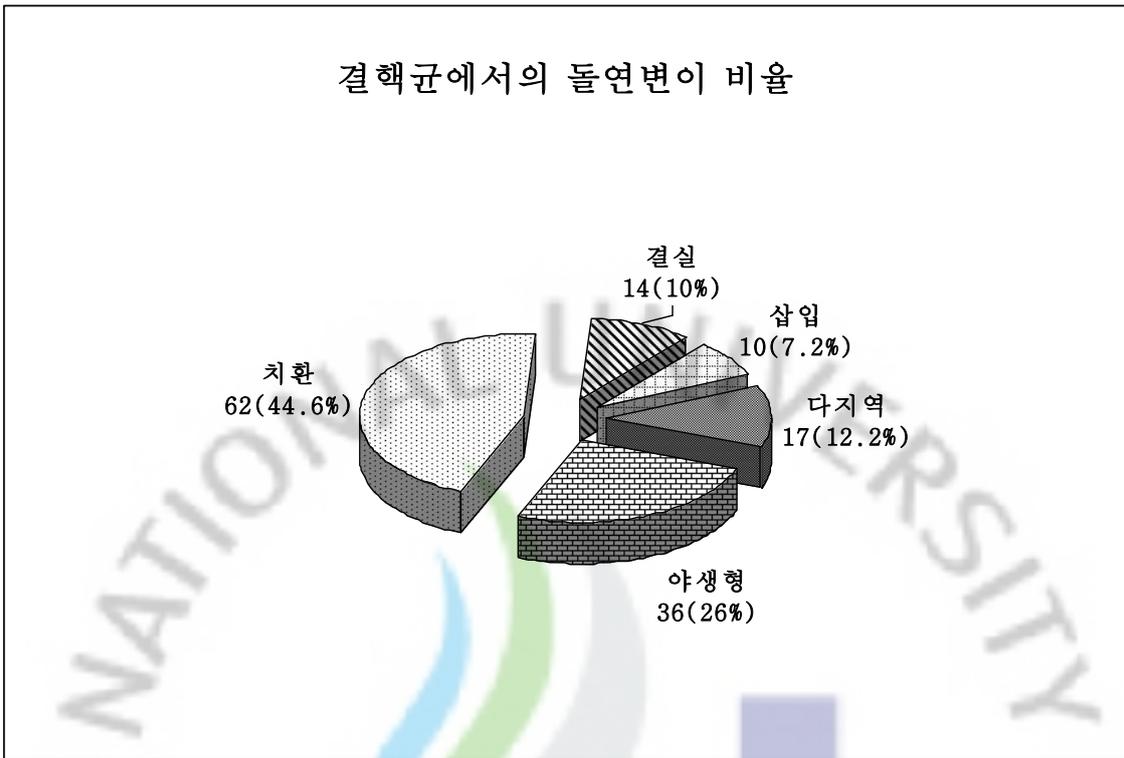


Figure 2. 결핵균에서의 돌연변이 비율. 총 139개의 결핵균(MDR, XDR-TB 포함)에서의 돌연변이 빈도를 표시하였다. 돌연변이 종류별로 표시하였으며 그 아래로 해당 돌연변이를 갖는 샘플의 개수를 기록하였고 괄호 안에 그 비율을 기록하였다. 치환이 돌연변이의 다수를 차지하며 나머지 돌연변이는 10% 내외의 비율을 기록하였다.

3-3. 폐외결핵 환자 조직 DNA에서 *pncA* 유전자 변이 분석결과

폐외결핵 환자 조직 DNA 총 29개 중 7개에서 돌연변이가 발견되었다.

폐 외 결핵의 경우 임상검체(specimens)에 결핵균이 소량 존재한다. 따라서 본 연구에서는 결핵균 배양뿐만 아니라 PZA 약제에 대한 감수성 검사는 실시하지 못하였다[38]. *pncA* 유전자 염기서열을 확인한 결과 미 보고된 돌연변이를 발견할 수는 없었으나 변이가 발견된 7개중 5개가 169번째 nucleotide가 사이토신에서 구아닌으로 바뀐 돌연변이였다(Table 4).



Table 4. *pncA* sequences of *M. tuberculosis* of extra-pulmonary TB from South Korean (total 29)

Nucleotide change(s) (nucleotide no.)	Amino acid change(s) (codon no.) ^a	% ^b (No.) of isolates	Susceptibility to PZA ^c	Diagnosis/Clinical specimens	Remarks
CAC>GAC (169) ^g	His (57) > Asp	17.2 (5)	NA ^d	extrapulmonary TB /Tissue (HIV positive), CSF (HIV positive), Lymph node	Bacille Calmette-Guerin (BCG) or <i>M. bovis</i>
CCC>CGC (248)	Pro (83) >Arg	3.4 (1)	NA	extrapulmonary TB /Colon tissue	Substitution
CGC>CAC (419)	Arg (140) >His	3.4 (1)	NA	extrapulmonary TB /Lymph node	Substitution
Wt ^e	Wt	75.9 (22)	NA	extrapulmonary TB /Sputum, Pus, Bone, Tissue, Bronchial wash, Lymph node	

^a Number of codon position was counted from the start codon (ATG) of the *pncA*

^b Percentage calculated based on extra pulmonary TB category

^c S, sensitive; R, resistant

^d NA, not available; ^e wt, wild type

^f New mutation not reported in previous studies

^g only present in *M. bovis* and BCG

169번째 nucleotide가 사이토신에서 구아닌으로 바뀐 돌연변이는 *M. tuberculosis*에서는 발견되지 않는 변이로 *M.bovis* 3종과, *M.bovis* BCG 아종 3종에서만 발견되는 돌연변이로 이러한 돌연변이로 인해 PZA 에 대해서 저항성을 가지게 되며, 169번째의 특징적인 치환은 *M. tuberculosis*에서 *M.bovis*나 *M.bovis* BCG로 빠르게 분화한 결과로 추정되고 있다[8].

따라서 5개의 폐외결핵 환자는 *M.tuberculosis*에 의한 감염이 아닌 *M.bovis*나 *M.bovis* BCG 아종 감염에 의한 결핵을 의미하며 *M.bovis*에 의한 감염확률이 매우 낮다는 점을 감안 했을 때 이는 BCG에 의한 결핵이며, 약독화 생백신인 BCG가 재활성 되었음을 의미한다.

약독화 생백신인 BCG는 AIDS환자, 유아와 같이 면역이 약하거나 결핍된 사람에서 BCG 재활성에 의한 결핵 발병에 대해서 보고된 바 있다[39].

5개의 폐외결핵에 대한 환자정보를 보면 2세 이하 유아 2명, 74세 남성 1명 HIV감염환자 2명으로 모두 면역력이 약하거나 결핍이 된 환자 군이었다. 따라서 위의 경우는 국내에서도 약독화 생백신인 BCG의 재활성에 의해서 결핵이 발생한 것으로 판단되며 본 연구에서 이러한 사실을 처음으로 확인하였다.

IV. 고 찰

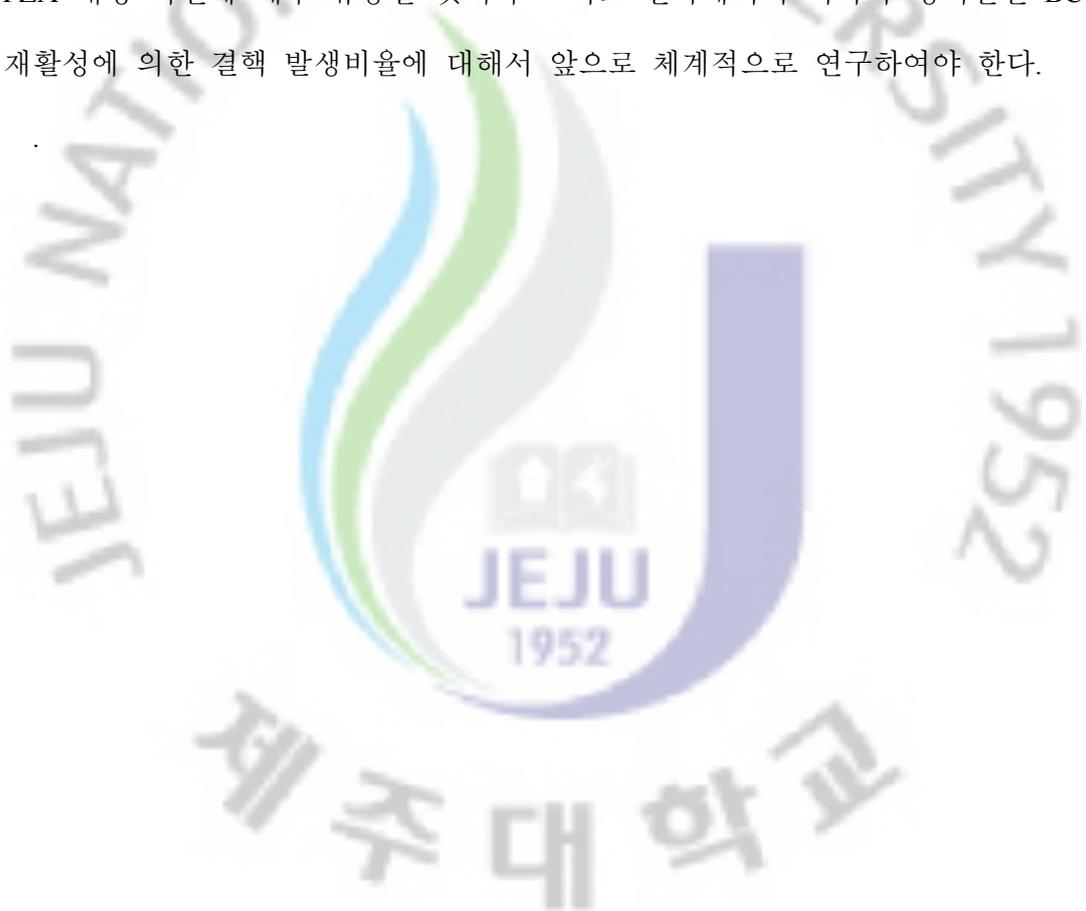
연구결과 PZA 감수성 검사 결과와 상관없이 총 168개 *M.tuberculosis* DNA에서 현재까지 발견되지 않은 42개의 *pncA* 돌연변이(*M.tuberculosis*: 4개, MDR-TB: 29개, XDR-TB: 9개)를 본 연구에서 발견하였다[7-37]. 폐외결핵 조직 DNA 샘플 중에는 BCG 재활성에 의한 결핵도 존재하였으며, PZA 저항성을 갖는데 *pncA*에서의 돌연변이 외에 다른 대체 경로의 존재를 의심케 하는 샘플도 발견할 수 있었다. 이러한 경우는 비단 본 연구뿐만 아니라 다른 논문에서도 보고되고 있는 만큼 *pncA*에서의 돌연변이 이외의 PZA 내성 원인에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 생각되며 *pncA* 조절 유전자의 존재 가능성에 대해서도 생각해 볼 필요가 있다. 따라서 이러한 존재가 규명될 경우 보다 나은 PZA 내성 결핵 발견에 도움이 될 것이다[26].

앞에서 본 것과 같이 약제 감수성 결핵균에서는 35%만이 돌연변이를 갖는 반면에 내성이 심해질수록 돌연변이를 갖는 샘플의 비율과 그 범위도 늘어나는 것으로 보여 약제내성과 *pncA*에서의 돌연변이간의 연관성이 있음을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 따라서 이에 대한 연구도 필요할 것으로 보인다.

한국에서는 결핵을 퇴치하고자 공중보건프로그램의 일환으로 모든 유아에게 BCG접종을 시행하고 있으며 안전성이 입증된 백신임에도 불구하고 외국사례를 보면 접종 이후에 BCG 관련 질병이 매개되거나 HIV에 감염되거나 되지 않은 어린이에서 BCG에 의한 질병이 매개되고 있다는 보고가 나오고 있는 것도 사실이다[39,40]. 이와 관련하여 한국에서도 약독화 생백신인 BCG 재활성에 의한 결핵발병 가능성이 존재함을 본 연구에서 처음으로 확인하였으며 BCG가 선천적으로 PZA에 대한 내성을 가지므로 질병의 유행 연구와 환자의 진단과 처방에 있어서도 *M.tuberculosis*에 의한 결핵과 BCG 재활성에 의한 결핵을 구분해야 할 필요가 있으며, 시간이 오래 걸리고 정확성이 떨어지는 배양 후

PZA 감수성 검사를 수행하는 것이 아니라 연쇄중합반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 기초로 한 *pncA* PCR-SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)와 같은 분자유전자 진단법 개발을 통해 신속하게 결핵균에 의한 결핵과 BCG 재활성에 의한 결핵을 구분해야 한다.

또한 *pncA*에서의 돌연변이와 PZA 내성과의 관계에 대해서 앞으로 더 많은 연구가 이루어 진다면 *pncA* 유전자내의 변이 확인이 가능한 염기서열분석이 PZA 내성 확인에 매우 유용할 것이다 그리고 한국에서의 약독화 생백신인 BCG 재활성에 의한 결핵 발생비율에 대해서 앞으로 체계적으로 연구하여야 한다.



V. 참 고 문 헌

1. 대한미생물학회, 의학미생물학 제6판, 현문사, **2009**.
2. WHO. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. WHO/HTM/TB 2008.393. Geneva: World Health Organization, **2008**
3. 대한결핵협회, 보건소 결핵 신환자의 약제 내성율, **1994,1998,2003**
4. Lee AS, Tang LL, Lim IH, Wong SY. Characterization of pyrazinamide and ofloxacin resistance among drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. Int. J Infect Dis. **2002**; 6:48-51
5. Salfinger M, Heifets LB. Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pH by the radiometric method. Antimicrob Agents Chemother **1988**; 32: 1002-4.
6. McClatchy JK, Tsang AY, Cernich MS. Use of pyrazinamidase activity on *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. Antimicrob Agents Chemother **1981**; 20: 556-7.
7. Trivedi SS, Desai SG. Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis*-a test of sensitivity to pyrazinamide. Tubercle **1987**;68: 221-4
8. 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**; 2:662-667
9. Miyagi C, Yamane N, Yogesh B, Ano H, Takashima T. Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan. Diagn. Microbiol. Infect Dis. **2004**; 48:111-116.
10. Bishop KS, Blumberg L, Trollip AP, Smith AN, Roux L, York DF, Kiepiela P

- Characterization of the *pncA* gene in *Mycobacterium Tuberculosis* isolates from Gauteng, South Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2001**; 5(10):952-957.
11. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, AuYeang CK, Yeung CY, Kam KM, Yip PC, Cheng AF. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**; 59:866-873.
 12. Hannan MM, Desmond EP, Morlock GP, Mazurek GH, Crawford JT. Pyrazinamide-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **2001**; 39:647-650.
 13. Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Dis.* **1998**; 78(2):117-122.
 14. Huang TS, Lee SS, Tu HZ, Huang WK, Chen YS, Huang CK, Wann SR, Lin HH, Liu YC. Correlation between pyrazinamide activity and *pncA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**; 47:3672-3673.
 15. Juréen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**; 52:1852-1854.
 16. Louw GE, Warren RM, Donald PR, Murray MB, Bosman M, Van Helden PD, Young DB, Victor TC. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2006**; 10(7):802-807.
 17. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**; 41:636-640
 18. Mphahlele M, Syre H, Valvatne H, Stavrum R, Mannsåker T, Muthivhi T, Weyer K,

- Fourie PB, Grewal HM. Pyrazinamide resistance among South African multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. **2008**; 46(10):3459-3464.
19. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, Brum L. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. Antimicrob. Agents Chemother. **2004**; 48:2736-2738.
20. Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae F, Kobayashi I, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Morita K, Suetake T, Yoshida H, Kato S, Mori T, Kirikae T. Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. Antimicrob. Agents chemother. **2007**; 45:2802-2807.
21. Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM, Kaswa M, Goh KS, Rastogi N, Salfinger M. Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific *pncA* mutation in "*Mycobacterium canettii*" and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. J. Clin. Microbiol. **2007**; 45(2):595-599.
22. Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, Nodieva A, Marga O, Skenders G. Spectrum of *pncA* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Latvia. Antimicrob. Agents Chemother. **2004**; 48:3209-3210
23. Rodrigues Vde F, Telles MA, Ribeiro MO, Cafrune PI, Rossetti ML, Zaha A. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. **2005**; 49:444-446.
24. Wade MM, Volokhov D, Peredelchuk M, Chizhikov V, Zhang Y Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray Diagn Microbiol Infect Dis. **2004**; 49(2):89-

- 97.
25. Barco P, Cardoso RF, Hirata RD, Leite CQ, Pandolfi JR, Sato DN, Shikama ML, de Melo FF, Mamizuka EM, Campanerut PA, Hirata MH *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *J Antimicrob Chemother.* **2006**; 58(5):930-935.
26. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44(3):528-532.
27. Marttila HJ, Marjamäki M, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV, Viljanen MK. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**; 43(7):1764-1766.
28. Denkin S, Volokhov D, Chizhikov V, Zhang Y. Microarray-based *pncA* genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* *J Med Microbiol.* **2005**; 54(Pt 12):1127-1131.
29. Park SK, Lee JY, Chang CL, Lee MK, Son HC, Kim CM, Jang HJ, Park HK, Jeong SH *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *BMC Infect Dis.* **2001**; 1:4
30. Lee KW, Lee JM, Jung KS. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J. Korean. Med. Sci.* **2001**; 16(5):537-543.
31. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T, Kirikae T. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.*

- 2007**; 45(1):179-192.
32. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, Woodley CL, Cooksey RC. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44(9):2291-2295.
33. Lemaître N, Sougakoff W, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Antimicrob Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *PncA*. *Agents Chemother.* **1999**; 43(7):1761-1763.
34. Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother.* **2006**; 58(2):327-331
35. Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, Rossau R, Jannes G, Mijs W, De Smet KA, Portaels F, Van den Eeckhout E. Antimicrob Agents Chemother. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **1999**; 43(9):2317-2319.
36. Aragón LM, Garrigó M, Moreno C, Español M, Coll P. J Antimicrob Chemother. Evaluation of the BacT/ALERT PZA kit in comparison with the BACTEC 460TB PZA for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to pyrazinamide. **2007**; 60(3):655-7.
37. Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MT, Zanini MS, Salas CE. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Probes.* **2004**; 18(3):167-70
38. Yun YJ, Lee KH, Haihua L, Ryu YJ, Kim BJ, Lee YH, Baek GH, Kim HJ, Chung MS, Lee MC, Lee SH, Choi IH, Cho TJ, Chang BS, Kook YH. Detection and identification

of *Mycobacterium tuberculosis* in joint biopsy specimens by *rpoB* PCR cloning and sequencing. J Clin Microbiol. **2005**; 43(1):174-178.

39. Hesselning AC, Rabie H, Marais BJ, Manders M, Lips M, Schaaf HS, Gie RP, Cotton MF, van Helden PD, Warren RM, Beyers N. Bacille Calmette-Guérin vaccine-induced disease in HIV-infected and HIV-uninfected children. Clin Infect Dis. **2006**; 42:548-558..
40. Talbot EA, Perkins MD, Silva SF, Frothingham R. Disseminated bacille Calmette-Guérin disease after vaccination: case report and review. Clin Infect Dis. **1997**; 24:1139-1146.



감사의 글

어느 샌가 2년이라는 시간이 지났고 입학하기 무섭게 졸업을 앞두고 되었습니다. 나름의 각오를 하고 시작한 대학원 생활이었지만 힘든 때도 있었고 주변 사람들을 힘들게도 했으며 나의 진짜 모습을 발견하는 시간이기도 하였습니다.

부족함에 힘들어 하는 저에게 손 잡아주시고 때로는 다그치며 이끌어주신 저의 지도 교수님 이근화 교수님께 감사 드립니다. 첫 제자인 만큼 기대도 크셨을 텐데 거기에 다 보답해 드렸는지 모르겠습니다. 그리고 대학원 과정 동안 관심 갖고 조언을 해주신 고영상 교수님, 송병철 교수님, 김영리 교수님, 강기수 교수님, 홍성철 교수님, 김수영 교수님, 조문제 교수님, 정영배 교수님, 강희경 교수님, 현진원 교수님, 박덕배 교수님, 배종면 교수님 진심으로 감사 드립니다. 그리고 처음부터 대학원 생활을 함께하며 도와 준 구정은 선생님, 수현이, 그리고 나중에 들어왔음에도 많이 도와주지 못해 미안한 박다희, 최현쌤, 대학원 적응에 도움을 주신 최수길 선생님 그리고 조언과 격려를 아끼지 않으신 윤지현 선생님, 끈질기게도 물어보는 저를 귀찮아하지 않고 잘 가르쳐주신 임희경 선생님, 김영미 선생님께도 감사를 전합니다. 기천이형, 동욱이형도 감사 ㅋ

물심양면으로 지원을 아끼지 않으시고 늘 따뜻한 가족의 정으로 대해주신 아버지 김영주 박사님, 어머니 강양림 여사, 동생 선리 그리고 알게 모르게 정을 나누어주시는 친척분들에게도 감사 드립니다.

언제나 허심탄회하게 속마음을 내보여주었던 성준, 성훈, 영봉이와 멀리서도 서로 볼 날을 기다리는 도혁이 행님, 동현이 형, 만수, 대환이, 화영이, 대학생활의 한 축이 되어준 장근이 형, 현정 누나를 비롯한 많은 문비인들, 인도에서 함께 울고 웃었던 100여명의 선재수련 7차 인도인들과 닷새의 시간만으로 흔들리는 저를 잡아준 덕생법사님을 비롯한 깨장 오이구 회원님들, 정토인들 그리고 인

도에서 결핵으로 힘들어하던 인도인들의 눈빛까지, 당신들 덕에 제가 여기까지 왔습니다. 감사합니다. 그리고 마지막으로 언제나 저의 큰 버팀목이 되어주었던 미혜씨에게도 감사합니다. 앞으로도 서로가 서로의 버팀목이 되길 바랍니다. 미혜야 사랑한다.

