

***gyrA* Mutations Found Among Ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* is Isolated from Korea**

Junho Kim¹, Yeun Kim¹, Kiho Bae², Taek-Sun Song³, Sang-Nae Cho³ and Hyeyoung Lee^{1†}

¹*Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences,*

²*Department of Life Science, College of Liberal Arts and Sciences, Yonsei University, Wonju 220-710,*

³*Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea*

Ofloxacin has antimycobacterial activity that possibly contributes a pivotal role in the second-line drug regimens that are used for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. However, in some communities, the resistance rate of *Mycobacterium tuberculosis* to this agent is surging. Therefore, a rapid and accurate method that can be used to determine the resistance of *M. tuberculosis* to the ofloxacin can be very useful for effective treatment of the patients. As an effort to develop such a method, this study was set up to reveal general types of mutations that are related to ofloxacin resistance of *M. tuberculosis*. From previous studies, it has been well known that ofloxacin resistance is associated with mutations in a gene encoding the gyrase A subunit protein. In this study, we obtained 43 ofloxacin-resistant and 50 ofloxacin-susceptible *M. tuberculosis* clinical isolates from Masan National TB Hospital, and sequences of DNA fragment of 320 bp, region of *gyrA* corresponding to the ofloxacin resistance-determining region were analyzed. In brief, the results showed that a total of seven mutation types were found at *gyrA*. These mutations were all clustered within nucleotides 2574 to 2586 of the *gyrA* gene (codons 88 to 94). Codon 94 was the most frequently substituted site. Twenty-four of the 43 isolates had mutations at this position resulting in a total of five different types of amino acid changes (Asp→Ala, Asp→Gly, Asp→His, Asp→Tyr, and Asp→Asn). Five isolates contained a mutation at codon 90 resulting Ala→Val change. Four isolates had mutations at codon 91 causing a Ser→Pro change at this site. Two isolates contained a mutation at codon 88 and each of them resulted in different types of amino acid changes (Gly→Cys, Gly→Ala). On the other hand, polymorphic site at codon 95 was found in both ofloxacin-resistant and ofloxacin-susceptible isolates. From these results, we concluded that the rate of mutations present in *gyrA* among ofloxacin-resistant *M. tuberculosis* in Korea is similar to the general rates of mutations found throughout the world. Subsequently, an oligonucleotide probe was designed based on the results of sequence analysis and was used to develop a dot blot hybridization assay system to determine ofloxacin-resistance of *M. tuberculosis*. To evaluate this probe, dot-blot hybridization was carried out using other 57 clinical isolates, and the results showed that the dot-blot hybridization assay is good for detecting sequence alterations at *gyrA* gene.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Ofloxacin resistance, *gyrA*

서 론

세계 보건기구 (The World Health Organization)에 의해 'global emergency'로 선포되었을 만큼 결핵은 아직까지도 퇴치되지 않고 있는 세계적 보건문제이다. 현재 세계 인구의

1/3이 결핵의 원인균인 *Mycobacterium tuberculosis*에 감염되어 있고 매년 3백만 이상의 사람들이 결핵에 의해 죽어 가고 있다고 보고된다. 결핵은 선진국 보다는 개발도상국이나 후진국에서 더 큰 문제인 질병인데, 이는 열악한 환경이나 보건 정책의 부재에 그 원인이 있다고 볼 수 있을 것이다 (Canetti et al., 1969). 하지만 최근 들어서는 에이즈처럼 면역력이 약해진 환자들이 점점 증가하고 에이즈 환자들은 결핵균에 더 쉽게 감염되므로 에이즈와 *M. tuberculosis*에 동시에 감염된 환자의 수는 증가하는 추세에 있다. 따라서 결핵환자의 수도 전세계적으로 더욱 증가되고 있는 실정이며 이로 인해 다제내성 결핵 (Multidrug-resistant tuberculosis: MDR-TB)

* 논문 접수: 2005년 11월 12일

수정재접수: 2005년 12월 2일

† 교신저자: 이해영, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 매지리 234, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

Tel: 033-760-2740, Fax: 033-760-2195

e-mail: hylee@dragon.yonsei.ac.kr

역시 증가하는 추세에 있다 (Yew et al., 2000).

다제내성 결핵이란 1차 결핵 약제 가운데 리팜핀 (rifampin)이나 아이나 (isoniazid)에 동시에 내성을 갖거나 (Meier et al., 1996) 리팜핀을 포함한 두 개 이상의 약제에 내성을 가지는 결핵균에 의한 결핵을 일컫는다 (Moghazeh et al., 1996). MDR-TB의 증가에 따라 1차 결핵 약제에 의해 치료가 어려운 환자를 치료하기 위한 2차 결핵 약제의 중요성이 커지고 있다 (Jesus Ruiz-Serrano et al., 2000).

2차 항결핵 약제 가운데 Fluoroquinolone (FQ) 계열의 약제들이 가장 유용한 것으로 알려져 있고 3세대 퀴놀론 항균제로 임상에서 널리 사용되고 있다 (Dong et al., 1998). FQ의 계열의 약제들 중 결핵 치료에는 ofloxacin이 가장 많이 사용되고 있다 (Fattorini et al., 1999). FQ의 세포 내로의 유입은 세포막의 지질 이중층을 통해 유입되거나 세포 외막에 존재하는 porin 단백질에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다 (Kocagoz et al., 1996). 세포 내로 들어온 FQ의 작용 부위는 DNA의 나선 구조를 유지하면서 DNA의 잘려진 부위를 봉합하는 Topoisomerase II로 알려져 있다. Topoisomerase II는 *gyrA*에서 만드는 A subunit과 *gyrB*에서 만드는 B subunit이 각각 두 개씩 합쳐져 이루어져 있다 (Lu et al., 1999). DNA가 복제되기 위해서는 수소 결합을 통하여 붙어 있는 두 개의 가닥이 분리되어야 하는데 이때 가닥을 끊어주고 다시 결합시키는 과정은 subunit A가 하며 이때 필요한 에너지를 제공하는 ATPase의 기능을 subunit B가 담당한다. FQ는 gyrase subunit A에 작용하는 것으로 알려져 있다 (Guillemin et al., 1998).

지금까지 알려져 있는 FQ에 대한 내성 기전으로는 DNA gyrase의 친화력 감소나 efflux pump에 의한 FQ의 배출 등이 있다 (Takiff et al., 1999; Xu et al., 1996). 결핵균에서 FQ에 내성을 일으키는 돌연변이는 DNA gyrase A에서 일어난다고 알려져 있고, 특히 codon 88~94 부위에 FQ 내성과 관련된 돌연변이가 집중적으로 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이 부위를 QRDR (Fluoroquinolone Resistant Determining Region) 이라고 한다 (Grimaldo et al., 2001).

이 연구는 한국에서 분리된 결핵균주 가운데 ofloxacin에 내성인 결핵균주를 대상으로 *gyrA* 유전자변이와 ofloxacin 내성과의 연관 관계를 알아보기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

1. 균 주

국립 마산결핵병원에 내원한 결핵환자들로부터 채취한 샘플 가운데 결핵균 배양검사를 통해 결핵으로 판명된 균주를 대상으로 Löwenstein-Jensen 배지에서 절대농도법을 이용하여 약제 감수성 검사 (Drug susceptibility test: DST)를 수행하

였다. 배지에 포함된 각 약제의 내성 기준 농도는 다음과 같다: isoniazid 0.2 µg/ml; rifampin 40 µg/ml; ofloxacin 2 µg/ml; para-aminosalicylic acid 1 µg/ml; streptomycin 10 µg/ml; ethambutol 2 µg/ml; ethionamide 2 µg/ml; cycloserine 30 µg/ml; kanamycin 40 µg/ml; pyrazinamide는 pyrazinamidase test로 내성 여부를 검사하였다. 표준균주로는 결핵균주 H37Rv를 사용하였다. 이 가운데 ofloxacin에 내성인 43개의 결핵균주와 감성인 50 균주를 대상으로 1차적으로 염기서열 분석실험을 수행하였다. 그리고, dot blot hybridization을 위해, 국립 마산결핵병원으로부터 추가로 ofloxacin에 내성인 48개의 결핵균주와 감성인 9개의 결핵균주를 얻었다.

2. 결핵균 DNA의 분리

결핵균 DNA는 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)를 사용한 방법에 의해 준비되었다 (Telenti et al., 1993). Ogawa 배지에서 배양된 균은 생리식염수에 현탁하여 70°C에서 20분간 불활성화 시키고 원심분리하여 모은 뒤 상층액을 버리고 400 µl TEN 완충액 (0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.01 M EDTA pH 7.5, 1 M NaCl)에 부유시킨 후, 동량의 saturated phenol과 지름 0.1 mm의 zirconium bead를 넣고 2분 40초 동안 minibeat-beater에서 저속으로 진탕하고 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 400 µl에 120 µl의 5 M NaCl과 100 µl의 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)/NaCl (10% CTAB, 0.7 M NaCl)을 첨가하고 혼합한 후 70°C에서 20분간 가온기에서 처리하였다. 가온 후 200 µl의 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 가하여 섞은 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액에 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24:1)을 가하고 잘 혼합한 후 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액에 3배의 무수 냉에탄올을 첨가하고 잘 흔든 후 -20°C에 하룻밤 방치하고 다음 날 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% 에탄올로 세척한 다음 물기를 제거하고 공기 중에 건조시켰다. 30 µl 멸균 증류수에 DNA를 녹인 후 정량하고 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

3. PCR

gyrA 중에서 FQ에 대한 내성을 결정하는 부위가 포함되는 320 bp 부위를 증폭하기 위한 PCR은 Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 2700, Perkin-Elmer Cetus, Boston, MA, USA)를 사용하였다. 전체 반응 부피는 50 µl로 하여 PCR AccuPower premix (Bioneer Co., Daejeon, Korea) 제품을 사용하였다. PCR에 사용된 Genomic DNA의 양은 반응당 50 ng이었고 PCR 과정에서 주형 DNA대신 멸균된 증류수를 첨가하여 negative control 반응을 실시하였다. 이때 사용된 PCR primer는 5'-CAGCTACATCGACTATGAGA-3'와 5'-GGGCT-

Table 1. Mutations found among 43 ofloxacin-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*

Mutation 부위	Changed AA (Amino acid)	No	Total %
No mutation		4	9
88	GGC (Gly) → TGC (Cys)	1	5
	GGC (Gly) → GCC (Ala)	1	
90	GCG (Ala) → GTG (Val)	6	14
91	TCG (ser) → CCG (Pro)	5	12
	GAC (Asp) → GGA (Gly)	1	
94	GAC (Asp) → GGC (Gly)	14	56
	GAC (Asp) → GCC (Ala)	4	
	GAC (Asp) → TAC (Tyr)	2	
	GAC (Asp) → CAC (His)	2	
	GAC (Asp) → AAC (Asn)	2	
94	90	GAC (Asp) → GGC (Gly)	1
		GCG (Ala) → GTG (Val)	
Total		43	100

Gly, Asp→His, Asp→Tyr, and Asp→Asn (Fig. 1), 총 43개의 내성균주 중 24개 균주가 codon 94 부위에 돌연변이가 있어 가장 높은 비율의 돌연변이를 가지고 있었다. Codon 94 부위에 돌연변이를 갖고 있지 않은 19개의 균주 중에서는, codon 90 부위의 아미노산이 Ala에서 Val로 바뀌는 결과를 가져오는 점돌연변이가 5 균주가 존재하였고, codon 91 부위의 Ser을 Pro으로 변화시키는 돌연변이를 가진 4 균주가 존재했다. 한편, codon 88 부위에는 두 개의 돌연변이 종류가 존재하였는데, 하나는 아미노산을 Gly에서 Cys로 다른 하나는 Gly에서 Ala로 변화시키는 점돌연변이였다 (Fig. 1, Table 1).

결과적으로 실험에 사용한 총 43개의 ofloxacin 내성 결핵균주 가운데 codon 95 부위에 존재하는 polymorphism이 아닌 여타 돌연변이를 가지고 있는 균주의 총 수는 39 균주였고 4개의 균주는 이 부위에 돌연변이가 없었다.

2. Dot blot hybridization을 위한 probe 개발

마산 국립결핵병원에서 1차로 받아 염기서열을 분석한 결과 QRDR에 돌연변이가 있는지의 여부를 dot blot hybridization을 이용하면 알아낼 수 있을 것으로 생각되었다. 따라서, 돌연변이가 없는 QRDR에 결합할 수 있는 wild type (WT) probe를 고안하였다. 이 WT probe는 polymorphism 부위인 95 부위를 제외한 돌연변이 부위 (codon 88~94)에 결합할 수 있는 21 mer 길이의 probe이다. 이 probe를 이용하여 돌연변이가 없는 codon 88~94 부위에는 결합하고 돌연변이가 존재하는 부위에는 결합하지 않도록 hybridization condition을 조절하였다.

이어 고안된 probe의 유용성을 알아보기 위해, 염기서열 분석을 통해 이미 염기서열이 확인된 균주를 이용하여

Table 2. Comparison of results between dot blot hybridization and conventional drug susceptible test

DST	Dot blot	S	R
	S		7
R		25	23

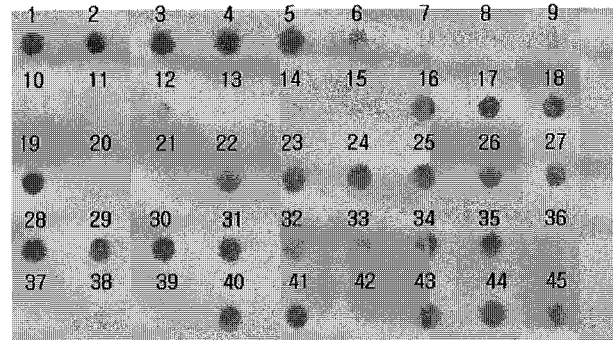


Fig. 2. Dot blot hybridization using wild type probe with clinical isolates of *M. tuberculosis*. No.1~5: Ofloxacin susceptible clinical isolates of *M. tuberculosis* that do not have mutations at QRDR region; No.6~14: Ofloxacin-resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* that have various kinds of mutations: No.6; 88GGC→TGC, No.7; 88GGC→GCG, No.8; 90GCG→GTG, No.9; 91TCG→CCG, No.10; 94GAC→AAC, No.11; 94GAC→GGC, No.12; 94GAC→GCC, No.13; 94GAC→TAC, No.14; 94GAC→CAC; No.16~45: Clinical isolates of *M. tuberculosis* their sequence alterations of QRDR are not known.

dot blot hybridization을 실시하였다. 그 결과 WT probe는 *gyrA*의 QRDR에 돌연변이가 없는 균주의 PCR 산물에는 결합하는 반면 어떤 종류의 돌연변이라도 돌연변이가 존재하는 균주의 PCR 산물에는 결합하지 않음을 알 수 있었다 (Data not shown). 이로써 design한 WT probe가 돌연변이가 없는 wild type 염기서열에만 특이적으로 결합 반응을 보인다는 것을 알 수 있었다.

3. Dot blot hybridization을 이용한 임상 결핵균주의 ofloxacin 내성 검출

Dot blot hybridization을 이용하여 2차적으로 마산 국립결핵병원에서 제공받은 ofloxacin 감성 9 균주와 ofloxacin 내성 48 균주의 총 57개의 균주를 가지고 그 유용성을 확인하는 실험을 실시하였다 (Fig. 2). 실험을 통해 얻어진 dot blot hybridization 결과와 ofloxacin 감수성 결과를 비교해 보니 일치된 결과를 보이는 균주가 총 30주였다. 즉, DST 감수성이고 dot blot hybridization에 붙는 균주가 7 균주였고 DST 내성이고 dot blot hybridization에 붙지 않는 균주가 23 균주였다. 반면, dot blot hybridization에 붙고 DST 결과가 내성인 균주가 25주였으며 dot blot hybridization에 붙지 않았는데

DST 결과가 감수성인 균주도 2주 있었다 (Fig. 2, Table 2).

Dot blot hybridization 실험 결과를 확인하기 위해, 이 중 dot blot hybridization에 의해 *gyrA* 돌연변이가 없는 것으로 확인된 10개 균주와 돌연변이가 있는 것으로 확인된 10개 균주, 총 20개 균주를 골라 ofloxacin 내성 부위와 관련된 *gyrA* 부위를 염기서열을 분석하였다. Dot blot hybridization 결과와 염기서열 분석 결과는 100% 일치하였다. 따라서, 2차적으로 마산 국립결핵병원에서 제공받은 57개의 균주 중 *gyrA* 부위의 돌연변이에 의한 결핵균주의 ofloxacin 내성율은 52%였다.

고 찰

본 연구에서는 한국에서 분리된 *M. tuberculosis* 임상균주를 대상으로 ofloxacin 내성과 관련된 것으로 알려진 *gyrA*의 QRDR에 존재하는 돌연변이 분포 양상을 분석하였다. 그 결과, *gyrA*의 codon 88~94 부위가 특히 ofloxacin 내성과 밀접한 연관 관계가 있음을 알 수 있었다. 분자생물학적 방법인 hybridization assay를 이용하여 신속하고 정확하게 *gyrA*의 QRDR을 검출할 수 있는지를 평가하였다. 이를 위해, 마산 국립결핵병원으로부터 1차적으로 얻은 ofloxacin 감성을 보이는 50 결핵균주와 ofloxacin에 내성을 보이는 43 결핵균주로부터 genomic DNA를 분리하여 ofloxacin 내성에 관련된 것으로 알려진 *gyrA*의 QRDR 부위를 PCR을 이용하여 증폭하여 염기서열 분석을 수행하였다.

*gyrA*의 염기서열을 분석한 결과, 총 93개의 결핵균주 중 ofloxacin 감성균주나 내성균주를 막론하고 90 균주에서 codon 95 부위에 돌연변이가 존재하는 것을 알 수 있었다. 따라서 codon 95 부위의 돌연변이는 이전 논문들에서도 보고된 바와 같이, ofloxacin 내성과 관련 없는 polymorphism 부위임을 알 수 있었다.

Ofloxacin 내성을 갖는 43 균주 가운데 39 균주가 *gyrA*에서 총 4개의 codon 부분에서 총 9종류의 돌연변이를 갖고 있었다. 이들 돌연변이는 모두 QRDR로 알려진 서열 2568에서 2586 사이에 모여 있었다 (codon 88 to 94). 이들 돌연변이 중, codon 94 부위에 일어난 돌연변이의 종류가 5가지로 가장 많았고, 염기서열이 분석된 43개의 내성 균주 중에서 24개 결핵균주가 이 부위에 돌연변이가 있어서 (56%) 가장 높은 비율의 돌연변이를 가지고 있었으며, 이들 모두 아미노산을 변화시키는 missense 돌연변이였다 (Fig. 1).

Codon 90 부위의 돌연변이가 5개 (14%), codon 91 부위에서 돌연변이가 4개 (12%), codon 88 부위에서의 돌연변이가 2개 (5%)를 차지했다. 결과적으로 실험에 사용한 총 43 균주의 ofloxacin 내성 결핵균주 가운데 95 polymorphism이 아닌 내성관련 돌연변이를 가지고 있는 균주의 총 수는 39 균주였

고 4개의 균주는 이 부위에 돌연변이가 없었기 때문에 *gyrA* 부위의 돌연변이에 의한 결핵균주의 ofloxacin 내성율은 91%였다. 이 비율은 지금까지 알려진 연구 결과 (40~80%)와 비교해 볼 때 약간 높은 수치이다. 따라서 더 많은 ofloxacin 내성 결핵균주의 QRDR에 존재하는 돌연변이를 PCR-직접 염기서열 분석이 아닌 더 신속하고 간편한 방법으로 dot blot hybridization을 위한 probe (WT probe)를 고안하였다.

고안된 probe와 dot blot hybridization을 이용하여 염기서열이 확인된 균주를 대상으로 WT probe가 돌연변이가 없는 균주를 검출할 수 있는지의 여부를 확인하였다. 이 probe는 ofloxacin 내성에 관여하는 것으로 잘 알려진 QRDR 돌연변이 부위 (codon 88~94)를 포함하지만 polymorphism 부위인 95 부위는 포함하지 않는 probe이다.

이어, dot blot hybridization을 이용하여 2차적으로 마산 국립결핵병원에서 제공받은 ofloxacin 감성 9개 균주와 ofloxacin 내성 48개 균주의 총 57개 균주를 가지고 그 유용성을 확인하는 실험을 실시하였다.

실험을 통해 얻어진 dot blot hybridization 결과와 ofloxacin 감수성 결과를 비교해 본 결과 총 57개 중 30개가 일치하여 약 52.6%가 일치성을 보였다. 이 중에서, DST 감수성이고 dot blot hybridization에 붙는 균주가 7 균주였고 DST 내성이고 dot blot hybridization에 붙지 않는 균주가 23 균주였다. Dot blot hybridization 결과와 ofloxacin 감수성 결과의 일치율을 보이지 않은 27 균주 (47.4%)는 dot blot hybridization에는 붙고 DST 결과가 내성인 25 균주와 dot blot hybridization에 붙지 않지만 DST 결과는 감수성인 2 균주였다.

Dot blot hybridization에 붙고 DST 결과가 내성인 결과를 보이는 균주는 ofloxacin 대한 내성의 원인이 *gyrA*의 QRDR 부위의 돌연변이 때문이 아닌 다른 원인에 의해 생기는 ofloxacin 내성균주이기 때문으로 생각할 수 있다. 이전까지의 연구 결과를 보면, 지금까지 알려져 있는 *gyrA*에 존재하는 QRDR 부위의 돌연변이 이외의 FQ에 대한 내성 기전으로는 *gyrB*의 돌연변이, DNA gyrase의 친화력 감소나 efflux pump에 의한 FQ의 배출이 있다 (Takiff et al., 1999; Xu et al., 1996).

Dot blot hybridization에 붙지 않았는데 DST 결과가 감수성인 균주도 2주 존재하였는데 이는 DST 실험이 잘못 되었거나 감성균주와 내성균주가 섞인 샘플인 것으로 '생각되어진다. Dot blot hybridization 실험 결과를 확인하기 이 중 dot blot hybridization에 의해 *gyrA* 돌연변이가 없는 것으로 확인된 10개 균주와 돌연변이가 있는 것으로 확인된 10개 균주, 총 20개 균주를 골라 ofloxacin 내성 부위와 관련된 *gyrA* 부위를 염기서열 분석하였다. Dot blot hybridization 결과와 염기서열 분석 결과는 100% 일치하여 개발된 probe가 유용함을 알았다.

2차로 얻은 결핵균주 중 약제 감수성 결과가 내성인 균은 48개였고 dot blot hybridization 결과에 의해 내성을 보이는 균은 25 균주였다. 즉, *gyrA* 부위의 돌연변이에 의한 결핵균주의 ofloxacin 내성율은 52%였다. 이는 1차로 얻은 ofloxacin 내성균주 가운데 QRDR에 돌연변이를 가지고 있는 비율과 비교할 때와는 현격한 차이를 보이는 것이었다. 따라서 앞으로 좀 더 많은 균주를 대상으로 ofloxacin 내성균주 가운데 *gyrA*에 돌연변이가 있는 균주의 비율을 조사할 필요가 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2002년도에 선정된 한국학술진흥재단의 신진교수지원사업 연구비 (KRF-2002-003-E00140) 지원에 의해 이뤄졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Alangaden GJ, Manavathu EK, Vakulenko SB, Zvonok NM, Lerner SA. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995. 39: 1700-1703.
- Canetti G, Wallace F, Khomenko A, Mahler H, Menon N, Mitchison D, Rist N, Smelev N. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull WHO.* 1969. 41: 21-43.
- Dong Y, Xu C, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998. 42: 2978-2984.
- Dong Y, Zhao X, Domagala J, Drlica K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. 43: 1756-1758.
- Dong Y, Zhao X, Kreiswirth BN, Drlica K. Mutant prevention concentration as a measure of antibiotic potency: studies with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000. 44: 2581-2584.
- Fattorini L, Iona E, Ricci ML, Thoresen OF, Orru G, Oggioni MR, Tortoli E, Piersimoni C, Chiaradonna P, Tronci M, Pozzi G, Orefici G. Activity of 16 antimicrobial agents against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Drug Resist.* 1999. 5: 265-270.
- Fung-Tomc J, Minassian B, Kolek B, Washo T, Huczko E, Bonner D. *In vitro* antibacterial spectrum of a new broad-spectrum 8-methoxy fluoroquinolone, gatifloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2000. 45: 437-446.
- Gillespie SH, Billington O. Activity of moxifloxacin against mycobacteria. *J Antimicrob Chemother.* 1999. 44: 393-395.
- Grimaldo ER, Tupasi TE, Rivera AB, Quelapio MI, Cardano RC, Derilo JO, Belen VA. Increased resistance to ciprofloxacin and ofloxacin in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients seen at a tertiary hospital in the Philippines. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001. 5: 546-550.
- Guillemin I, Jarlier V, Cambau E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998. 42: 2084-2088.
- Jesus Ruiz-Serrano M, Alcalá L, Martínez L, Díaz M, Marin M, Jose Gonzalez-Abad M, Bouza E. *In vitro* activities of six fluoroquinolones against 250 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* susceptible or resistant to first-line anti-tuberculosis drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000. 44: 2567-2568.
- Ji B, Lounis N, Maslo C, Truffot-Pernot C, Bonnafous P, Grosset J. *In vitro* and *in vivo* activities of moxifloxacin and clinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998. 42: 2066-2069.
- Kitamura A, Hoshino K, Kimura Y, Hayakawa I, Sato K. Contribution of the C-8 substituent of DU-6859a, a new potent fluoroquinolone, to its activity against DNA gyrase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995. 39: 1467-1471.
- Kocagoz T, Hackbarth CJ, Unsal I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996. 40: 1768-1774.
- Lalande V, Truffot-Pernot C, Paccaly-Moulin A, Grosset J, Ji B. Powerful bactericidal activity of sparfloxacin (AT-4140) against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1993. 37: 407-413.
- Lu T, Zhao X, Drlica K. Gatifloxacin activity against quinolone-resistant gyrase: allele-specific enhancement of bacteriostatic and bactericidal activities by the C-8-methoxy group. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. 43: 2969-2974.
- Lu T, Zhao X, Li X, Drlica-Wagner A, Wang JY, Domagala J, Drlica K. Enhancement of fluoroquinolone activity by C-8 halogen and methoxy moieties: action against a gyrase resistance mutant of *Mycobacterium smegmatis* and a gyrase-

- topoisomerase IV double mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001. 45: 2703-2709.
- McIlhatton BP, Keating C, Curran MD, McMullin MF, Barr JG, Madrigal JA, Middleton D. Identification of medically important pathogenic fungi by reference strand-mediated conformational analysis (RSCA). *J Med Microbiol*. 2002. 51: 468-478.
- Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Bottger EC. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996. 40: 2452-2454.
- Miyazaki E, Miyazaki M, Chen JM, Chaisson RE, Bishai WR. Moxifloxacin (BAY 12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999. 43: 85-89.
- Moghazeh SL, Pan X, Arain T, Stover CK, Musser JM, Kreiswirth BN. Comparative antimicrobial activities of rifampin, rifampentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* Mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996. 40: 2655-2657.
- Pelman DC, El Sadr WM, Heifets LB, Nelson ET, Matts JP, Chirgwin K, Salomon N, Telzak EE, Klein O, Kreiswirth BN, Musser JM, Hafner R. Susceptibility to levofloxacin of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with HIV-related tuberculosis and characterization of a strain with levofloxacin monoresistance. *AIDS*. 1997. 11: 1473-1478.
- Rastogi N, Labrousse V, Goh KS. *In vitro* activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Curr Microbiol*. 1996. 33: 167-175.
- Renau TE, Gage JW, Dever JA, Roland GE, Joannides ET, Shapiro MA, Sanchez JP, Gracheck SJ, Domagala MJ, Jacobs MR, Reynolds RC. Structure-activity relationships of quinolone agents against mycobacteria: effect of structural modifications at the 8 position. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996. 40: 2363-2368.
- Saito H, Tomioka H, Sato K, Dekio S. *In vitro* and *in vivo* antimycobacterial activities of a new quinolone DU-6859a. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994. 38: 2877-2882.
- Saito H, Sato K, Tomioka H, Dekio S. *In vitro* antimycobacterial activity of a new quinolone, levofloxacin (DR-3355). *Tuberc Lung Dis*. 1995. 76: 377-380.
- Sougakoff W, Lemaitre N, Cambau E, Szpytma M, Revel V, Jarlier V. Nonradioactive single-strand conformation polymorphism analysis for detection of fluoroquinolone resistance in mycobacteria. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997. 16: 395-398.
- Takiff H, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs Jr WR, Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of the *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes, and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994. 38: 773-780.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct automated detection of rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and single-strand conformation polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993. 37: 2054-2058.
- Woodcock JM, Andrews JM, Boswell FJ, Brenwald NP, Wise R. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997. 41: 101-106.
- Xu C, Kreiswirth BN, Sreeratsan S, Musser JM, Drlica K. Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 1996. 174: 1127-1130.
- Yew WW, Chan CK, Chau CH, Tam CM, Leung CC, Wong PC, Lee J. Outcomes of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treated with ofloxacin/levofloxacin-containing regimens. *Chest* 2000. 117: 744-751.