

역교잡 방법을 이용한 결핵균 *embB* 유전자 돌연변이 검출

¹결핵연구원, ²성균관대학교 의과대학 내과학교실 삼성서울병원 호흡기내과, ³연세대학교 의과대학 미생물학교실 박영길¹, 유희경¹, 박찬홍¹, 류성원¹, 이승현¹, 심명섭¹, 류우진¹, 고원중², 권오정², 조상래³, 배길한¹

Detection of *embB* Gene Mutation of *Mycobacterium tuberculosis* by Reverse Hybridization Assay

Young Kil Park, Ph.D., Hee Kyung Yu, B.S., Chan Hong Park, B.S., Sung Weon Ryu, M.S., Seung Heon Lee, M.S., Myung Sup Shim, B.S., Woo Jin Lew, M.D., Won-Jung Koh, M.D., O Jung Kwon, M.D., Sang Nae Cho, Ph.D. Gill Han Bai, Ph.D.

¹Korean Institute of Tuberculosis, Seoul, Korea, ²Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, ³Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Ethambutol (EMB) is one of important first-line drug in the treatment of tuberculosis. Molecular techniques to detect *embB* gene mutations have been considered as an method to define the EMB resistance. We investigated the mutation rate within *embB* gene among EMB resistant strains using reverse hybridization techniques.

Methods : We made 11 probes that had wild or mutated sequences containing codons 306, 406, or 497 within *embB* gene respectively. These probes were reverse-hybridized with PCR products amplified from *embB* gene which were isolated from 149 ethambutol resistant strains and 50 pan-susceptible strains.

Results : Out of 149 ethambutol resistant strains, one hundred (67.1%) had mutation at least one base at codon 306, 406, or 497 in *embB* gene. Mutation at codon 306, 406, 497 were demonstrated in 75 (50.3%), 16 (10.7%), and 13 strains (8.7%) respectively. There were four strains that showed multi-mutation at codon 306 and codon 406 simultaneously. A high proportion (8.1%) had single mutation at codon 406. There was no mutation observed in *embB* gene among 50 pan-susceptible strains.

Conclusion : Reverse hybridization will be useful technique for detection of gene mutation correlated to ethambutol resistance. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 58:129-134)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Genotypes, *EmbB*, Reverse hybridization, Ethambutol resistance

서 론

에탐부톨은 주요 치료 약결핵약제의 하나로서, 에탐부톨의 첨가로 *Mycobacterium smegmatis* 균내의 D-arabinose의 합성이 억제 되는 것을 발견하면서 그 작용 기작이 서서히 밝혀지기 시작하였다¹. Arabinan은 arabinogalactan과 lipoarabinomannan의 구성성분

이며, 이들의 합성은 서로 별개의 과정으로 이루어진다². 1997년에 이르러 Telenti 등이 이들 합성 과정에 관여하는 arabinosyltransferase를 만드는 세 개의 연속적인 유전자, 즉 *embCAB*를 발견하였다³. 이 유전자의 돌연변이는 에탐부톨 내성균에서만 분리되었는데, 내성균 중에서 특히 *EmbB* 단백질의 Met306 돌연변이가 가장 일반적인 것으로 보고 되었으며³, Sreevatsan 등도 Met306에서 여러 가지 돌연변이, 즉 Ile, Leu 또는 Val 등을 발견하였다⁴. Telenti 등도 *EmbB* 단백질의 아미노산 중에 306번 Met이 에탐부톨 내성을 결정하는 부위(EMB resistance determining region, ERDR)라는 사실을 발견하였다³. Alcaide 등이 부위의 아미노산은 *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. smegmatis* 기타 mycobacteria 등에서 큰 차이가 없는 것을 관찰하였으며, *M. leprae*, *M. abscessus*,

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(01-PJ10-PG6-01GM03-0002).

Address for correspondence : Gill Han Bai, Ph.D.
Korean Institute of Tuberculosis 14 Woomyundong,
Sochogu, Seoul, 137-900, Korea

Phone : 02-577-5766 Fax : 02-573-1914

E-mail : gbai@hotmail.com

Received : Oct. 27. 2004

Accepted : Dec. 30. 2004

M. chelonae 등의 균종이 보이는 자연적인 에탐부톨 고농도 내성은 ERDR의 변화와 관련이 있다고 보고 있다⁵. Ramaswamy 등은 에탐부톨 내성 결핵균을 대상으로 *embCAB*의 전체 유전자 뿐만 아니라 *iniBAC* 등의 유전자에서도 돌연변이를 발견하였다⁶.

이 연구에서는 우리나라에서 분리된 에탐부톨내성인 결핵균의 *embB* 유전자 내 306번, 406번, 497번 아미노산의 돌연변이 분포 상태를 파악하고자 하였으며, 향후 이를 이용하여 신속한 에탐부톨 내성균 검출 가능성을 검토하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 균주 수집 및 감수성검사

이 연구에서는 2003년도에 결핵연구원에 항결핵제에 대한 감수성검사가 의뢰된 균주 중에서 에탐부톨에 내성균인 149균주와 시험된 모든 항결핵약제에 감수성인 50균주를 시험에 사용하였다.

약제감수성 검사는 Löwenstein-Jensen (LJ) 배지 상에서 내성비율법에 따라서 실시하였다⁷. 약제 함유 농도는, 아이소니아지드 0.2 mcg/ml, 리팜핀 40 mcg/ml,

스트렙토마이신 4.0 mcg/ml, 에탐부톨 2.0 mcg/ml, 가나마이신 40.0 mcg/ml, 카프레오마이신 40.0 mcg/ml, 프로치오나마이드 40.0 mcg/ml, 사이클로세린 30.0 mcg/ml, 파스 1.0 mcg/ml, 오플로삭신 2.0 mcg/ml으로 하였으며, 대조배지 상 균 집락 수와 비교하여 1% 이상의 균이 발육 시 각 약제에 내성인 것으로 판정하였다. 피라지나마이드는 pyrazinamidase test로 내성 여부를 결정하였다⁷.

2. 중합효소연쇄반응-역교잡반응법

embB 유전자의 증폭을 위한 primer 및 돌연변이를 검출하기 위한 probe는 Table 1에 나타내었다. 돌연변이 검출을 위한 probe는 *embB* 유전자의 돌연변이를 잘 일으키는 306번 아미노산을 포함하는 codon 304-310, 406번 아미노산을 포함하는 codon 404-410, 그리고 497번 아미노산을 포함하는 codon 495-481 부위에서 정상적인 염기서열과 돌연변이 염기서열을 바탕으로 합성하였다. 이 probe들을 검출하기 위한 3종의 primer를 합성하였다.

중합효소연쇄반응의 annealing 온도는 65°C이었고, 중합효소연쇄반응 용량은 100 µl이었고, 성분은 10 x

Table 1. primers and probes for detection of mutation in *embB* gene.

Primers or probes	Oligonucleotides	Remark
<i>embB</i> forward primer 1 (EF1)	5' agctcctcctcaggcggttc 3'	from codon 250 to codon 256
<i>embB</i> reverse primer 1 (ER1)	5' cagactggcgtcgtgacat 3'	from codon 342 to codon 349, biotin labeling at 5' end
<i>embB</i> forward primer 2 (EF2)	5' agtgtgctggctgctgtgt 3'	from codon 359 to codon 365
<i>embB</i> reverse primer 2 (ER2)	5' cagtgtgaatgocggcggtaa 3'	from codon 436 to codon 442, biotin labeling at 5' end
<i>embB</i> forward primer 3 (EF3)	5' ttaccgocgattcacactg 3'	from codon 436 to codon 442
<i>embB</i> reverse primer 3 (ER3)	5' accctgtggcttccaacac 3'	from codon 502 to codon 508, biotin labeling at 5' end
Probes from <i>embB</i> , EW10	5' tcctgggcatgggcccaggt 3'	wild sequences from codon 304 to codon 310
EM11	5' tcctgggctgggcccaggt 3'	Point mutation from Met to Leu at codon 306
EM12	5' tcctgggctgggcccaggt 3'	Point mutation from Met to Val at codon 306
EM13	5' tcctgggcataggcccaggt 3'	Point mutation from Met to Ile at codon 306
EW20	5' ccggaggccatcatcgcgctc 3'	wild sequences from codon 404 to codon 410
EM21	5' ccggaggccatcatcgcgctc 3'	Point mutation from Gly to Ala at codon 406
EM22	5' ccggaggccatcatcgcgctc 3'	Point mutation from Gly to Asp at codon 406
EM23	5' ccggaggccatcatcgcgctc 3'	Point mutation from Gly to Ser at codon 406
EW30	5' gccgaccagaccctgtcaacg 3'	wild sequences from codon 495 to codon 481
EM31	5' gccgacaagaccctgtcaacg 3'	Point mutation from Gln to Lys at codon 497
EM32	5' gccgaccgaccctgtcaacg 3'	Point mutation from Gln to Arg at codon 497

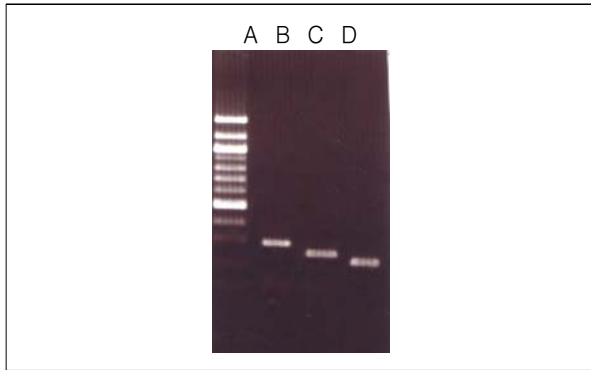


Figure 1. PCR products amplified from 3 sets of primer.

- A : size marker 100bp DNA ladder.
- B : 296bp amplified by primer EF1/ER1 for codon 306 mutation.
- C : 250bp amplified by primer EF2/ER2 for codon 406 mutation.
- D : 217bp amplified by primer EF3/ER3 for codon 497 mutation.

Taq polymerase buffer 10 ul, 2mM MgCl₂, 각 primer 20 pM, 2 mM의 4가지 dNTP, 1 U의 Taq polymerase (AP-Biotech, Uppsala, Sweden) 및 50-200 ng의 DNA 로 구성되었다. 중합효소 연쇄반응은 Perkin-Elmer 480 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Norwalk, CT. 06859 USA) 제품으로 실시하였다. 처음 denaturation 반응은 95°C 에서 10분 하였고, 이후 95°C 1분, 65°C 1분, 72°C 2분씩 중합효소 연쇄반응을 30회 반복 하였으며 마지막 extention 반응으로 72°C 10분을 실시하였다.

Probe EW10-EM31까지 조사하기 위한 primer EF1/ER1에 의한 PCR 산물은 296bp이었고, probe

EW20-EM23까지 조사할 primer EF2/ER2에 의한 산물은 250bp 이었다. 그리고 probe EW30-EM32를 조사하기 위한 primer EF3/ER3 산물은 217bp 이었다(Fig 1).

여러 유전자 돌연변이 검출을 위한 역교잡반응은 Kox 등의 방법을 적용하였다^{8,9}. 즉 probe들을 dTTP로 tailing하여 나일론막 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)에 고착시키고 cross blotter 기구(Accutran-Cross ACC 100/0; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)를 이용하여 중합효소연쇄반응 산물을 역교잡으로 반응시켰다. Probe와 교잡된 중합효소 연쇄반응 산물은 streptavidin-alkaline phosphatase를 처리한 다음 NBT/BCIP 기질로 발색시켰다.

결 과

1. 에탐부톨 내성균에서 *embB* 유전자 돌연변이 분포

에탐부톨 내성균 149균주 중에서는 각 probe에 대한 돌연변이를 조사한 결과, *embB* 유전자의 306번째 아미노산인 Met의 돌연변이는 75균주(50.3%)였다. 그 중에서 Met → Val (atg → gtg) 돌연변이는 53균주(35.6%)로 에탐부톨 내성균주 중 가장 많이 차지하였는데, 이 중 3균주는 406번 Gly → Ala (ggc → gcc) 돌연변이도 동시에 가지고 있었다. Met → Ile (atg → ata) 돌연변이는 20균주(13.4%)였는데, 이 중 1균주는 406번 Gly → Ser (ggc → agc) 돌연변이를 동시에 가지고 있었다. Met → Leu (atg → ctg) 돌연변이는 2균

Table 2. Distribution of *embB* gene mutation among ethambutol resistant strains.

Mutation site	Amino acid	Sequence	No. of strains (149)*	No. of strains (4)**
codon 306	Met → Leu	atg → ctg	2 (1.3%)	
	Met → Val	atg → gtg	53 (35.6%)	3
	Met → Ile	atg → ata	20 (13.4%)	1
	Gly → Ala	ggc → gcc	11 (7.4%)	3
codon 406	Gly → Asp	ggc → gac	3 (2.0%)	
	Gly → Ser	ggc → agc	2 (1.3%)	1
	Gln → Lys	cag → aag	4 (2.7%)	
codon 497	Gln → Arg	cag → cgg	9 (6.0%)	
none			49 (32.9%)	

* : Percentages in parenthesis were calculated using by total EMB resistant strains as a denominator(149).

** : 4 strains were overlapped because of multi loci mutations.

Table 3. Distribution of *embB* gene mutated loci of strains with various drug resistance.

Mutation site	E(2)	ER(1)	EHN(20)	EHRN(126)	Total(149)
codon 306	1		11*	63**	75***
codon 406			2*	14**	16***
codon 497			4	9	13
none	1	1	5	42	49

E: ethambutol resistant strain. ER: ethambutol and rifampicin resistant strain.

EHN: ethambutol, isoniazid, and any other drug resistant strains except rifampicin.

EHRN: ethambutol, isoniazid, rifampicin, and any other drug resistant strains.

Numbers of strains were indicated in parentheses.

*/**: 2 strains had multiple mutated loci at codon 306 and 406 simultaneously.

***: Total 4 strains had multiple mutated loci at codon 306 and 406 simultaneously.

주(1.3%)였다.

embB 유전자의 406번째 아미노산인 Gly의 돌연변이는 16균주(10.7%)에서 나타났다. 그 중 Gly → Ala 돌연변이는 11균주(7.4%), Gly → Asp (ggc → gac) 돌연변이는 3균주(2.0%), Gly → Ser 돌연변이는 2균주(1.3%)였다.

embB 유전자의 497번째 아미노산인 Gln의 돌연변이는 13균주(8.7%)에서 나타났다. 그 중 Gln → Lys (cag → aag) 돌연변이는 4균주(2.7%), Gln → Arg (cag → cgg) 돌연변이는 9균주(6.0%)였다.

에탐부톨 내성균 149주중 *embB* 유전자돌연변이를 나타낸 균은 모두 100균주(67.1%)였으며, 그 중 4균주는 중복돌연변이를 가지고 있었다(Table 2).

한편, 에탐부톨 및 타 항결핵약제에도 감수성인 50균주 모두가 실험에 사용된 probe에서 돌연변이를 나타내지 않았다.

2. 리팜핀내성과 *embB* 유전자 돌연변이 관계

전체 항결핵약제에 감수성인 균과는 달리 에탐부톨에는 감수성이나 기타 항결핵약제는 내성을 나타낸 결핵균 중에서는 *embB* 유전자 돌연변이가 발견된 경우가 있어서¹⁰, 본 연구에서는 에탐부톨 내성균 중에서 리팜핀 내성과 에탐부톨 *embB* 유전자 돌연변이와의 관련성 여부를 확인해보았다. 리팜핀에는 감수성이지만, 아이소니아지트와 에탐부톨에 동시 내성인 균 또는 이 두가지 약제 내성을 포함하여 기타 항결핵약제에도 내성을 갖는 균주가 20균주였다. 이 중에서 *embB* 유전자 돌연변이를 나타낸 균주는 15균주(75.0%)

였고, 그 중에서 306번 아미노산 돌연변이는 11균주(55.0%), 406번과 306번 돌연변이를 동시에 가진 균주가 2균주(10.0%), 497번 돌연변이는 4균주(20.0%)였다. 한편, 리팜핀, 아이소니아지트, 에탐부톨내성인 균과 이 세 가지 약제와 더불어 기타 항결핵약제에도 내성인 균주는 126균주 이었다. 이 중에서 *embB* 유전자 돌연변이를 나타낸 균주는 84균주(66.7%)였는데, 그 중에서 306번 아미노산 돌연변이는 63균주(50.0%), 406번 돌연변이는 14균주(11.1%)였는데 그 중 2균주는 306번 돌연변이를 동시에 가지고 있었으며, 497번 돌연변이는 9균주(10.7%)에서 나타났다 (Table 3). 전체적으로 에탐부톨 내성인 균주 중에서, 리팜핀 내성인 그룹과 리팜핀 감수성인 그룹간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p > 0.1$). 따라서 리팜핀내성과 *embB* 유전자 돌연변이 발생 간에 연관이 없는 것으로 나타났다. 실험에 사용된 에탐부톨 단독 내성인 균주 수는 너무 적었기에 비교하지 않았다.

고 찰

1999년도 우리나라 보건소에 등록된 도말 양성인 초치료 대상인 환자중에서 에탐부톨 내성인 환자들은 1.1%이었으며, 재치료 환자 중에서는 3.5%이었다¹¹. 결핵환자 중 에탐부톨 내성률이 아이소니아지트이나 리팜핀의 내성률만큼 높지는 않지만, 에탐부톨은 1차 항결핵약제의 하나로 단기화학 요법에 중요한 역할을 하므로, 에탐부톨 내성여부는 약제 처방전 결정에 매우 중요하다.

에탐부톨 (dextro-2,2'-(ethylene-diimino)-di-1-bur

anol)은 D-arabinose와 비슷한 구조를 가진 합성화합물로서 1961년 처음 개발 되어 그 해에 바로 결핵환자에게 적용되었다¹². 에탐부톨의 작용 스펙트럼은 결핵균 (*M. tuberculosis*)을 비롯한 비결핵마이코박테리아에까지 미친다. *M. kansasii* 에는 직접적으로 균 억제 능력이 있지만, *M. intracellulare*, *M. avium* 등에서는 타 약제의 효과를 상승시키기도 한다¹³. 에탐부톨의 작용기전에 대해서는 여러 견해가 있는데, 비결핵마이코박테리아를 대상으로 한 실험 결과를 보면, 에탐부톨은 RNA 대사 억제¹⁴, 인지질 합성 억제¹⁵, mycolic acid를 세포벽 연결 물질인 arabinogalactan 에로 전달 억제¹⁶, spermidine 합성 억제¹⁷, arbinogalactan 과 arabinomannan같은 세포벽 다당류 합성에 필요한 단당류의 생산을 억제 등이 항균 기전으로 제시되고 있다¹⁻². 한편으로 에탐부톨 내성에 영향을 주는 유전자가 *M. avium*에서 분리되어 *embA*, *embB*로 명명되었고¹⁸, 이어서 결핵균 (*M. tuberculosis*)에서도 연속적으로 존재하는 유전자(*embC*, *embA*, *embB*)가 발견되었다³.

본 연구에서 Löwenstein-Jensen 배지를 이용한 기존 약제감수성 검사 방법으로 에탐부톨에서 내성인 것으로 밝혀진 149개 결핵균 중에서 *embB* 유전자 전체에서 돌연변이가 나타난 균주는 67.1%로 이는 Ramsawamy의 조사 결과인 68%와도 비슷하였다⁶. 또 본 연구에서 *embB* 유전자 중 306번 돌연변이는 50.3%였는데 이는 Telenti 등의 결과인 47%와도 비슷하였다³. 본 연구에서 497번 돌연변이는 8.7%균에서 발견되었는데, Ahmad 등의 조사에서 이 돌연변이율은 14.3%로 이 연구 결과 보다 높았다¹⁹. 본 연구에서 406번 돌연변이는 10.7%이었는데, 이 중에 4균주는 306번 돌연변이를 동시에 가지고 있었으며, 406번 돌연변이 하나만 가지고 있는 균은 8.1%이었다. 이는 다른 연구결과들과 비교시에 매우 높은 수치이었다. 역교잡반응으로 찾아낸 돌연변이는 염기서열분석으로 확인한 결과는 모두 일치 하였다.

Mokrousov 등의 보고에 따르면 타약제 내성이면서 에탐부톨 감수성인 균주중에서 *embB* 유전자 돌연변이가 존재한다는 보고도 있는 바¹⁰, 이 연구에서는 에탐부톨 내성균중에서 리팜핀 내성과 *embB* 유전자 돌

연변이율은 관련이 없는 것으로 나타났지만, 향후 타약제 내성이면서 에탐부톨 감수성인 균주들을 대상으로 이에 대한 조사가 추후 되어야 할 것이다. 그러나 이 연구에서 에탐부톨을 포함한 11가지 항결핵약제에서 감수성인 50개균에서는 *embB* 유전자의 돌연변이를 발견하지 못하였으며, 이는 전체 항결핵약제에 감수성균주에서는 *embB* 유전자 돌연변이를 발견한 경우가 없다는 다른 보고와 일치하였다.

역교잡반응법으로 에탐부톨 내성에 관련되어 있는 것으로 알려진 *embB* 유전자 돌연변이를 찾는 것은 가능하지만, 앞으로 에탐부톨 내성 기작과 연관된 유전자가 정확하게 규명되고 여러 유전자가 더 발견되어 민감도가 높아지면, 역교잡 방법을 이용한 결핵균의 에탐부톨 내성의 검출법의 활용도가 높아질 수 있을 것으로 예견된다.

요 약

배 경 :

에탐부톨의 내성여부는 결핵 환자 처방 결정에 있어서 중요 변수의 하나가 된다. 에탐부톨 내성의 상당 부분이 *embB* 유전자의 돌연변이와 관계가 있으므로 역교잡반응법으로 이 유전자의 돌연변이를 신속하게 검출하고자 하였다.

방 법 :

에탐부톨 내성에 관련된 *embB* 유전자의 306번, 406번, 497번 아미노산의 정상적인 염기서열과 돌연변이 염기서열에 대한 probe를 합성하였고, 약제감수성검사서 에탐부톨 내성균으로 나타난 149균과 전약제 감수성으로 나타난 50개균을 대상으로 조사 하였다.

결 과 :

149개의 에탐부톨 내성균 중에서 *embB* 유전자 전체에서 돌연변이가 나타난 균은 100균주(67.1%)였으며, 그 중 *embB* 유전자 중 306번 돌연변이를 가진 균주가 75주(50.3%), 406번 돌연변이를 가진 균주가 16주(10.7%), 497번 돌연변이가 있는 균주가 13주(8.7%)였다. 이 중 4균주는 306번과 406번 돌연변이를 동시에 가지고 있었다. 406번 돌연변이 하나만 가지고 있

는 균은 12균주(8.1%)로 이는 다른 조사에서 볼 수 없었던 비교적 높은 수치이었다. 한편 에탐부톨 및 11가지 항결핵약제에서 감수성인 50개균에서는 *embB* 유전자의 돌연변이를 발견하지 못하였다.

결 론 :

역교잡반응법으로 에탐부톨 내성에 관련되어 있는 것으로 알려진 *embB* 유전자 돌연변이를 찾는 것이 가능하였으며, 에탐부톨 내성기전 및 관련 유전자가 더 발견되어 민감도가 향상된다면 신속한 에탐부톨내성균 검출이 가능할 것으로 본다.

참 고 문 헌

1. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1493-9.
2. Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2484-9.
3. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* 1997;3:567-70.
4. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR Jr, et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1677-81.
5. Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2270-3.
6. Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S, Stager CE, Dou SJ, el Sahly H, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:326-36.
7. Kim SJ, Bai GH, Hong YP. Drug resistant tuberculosis in Korea, 1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:302-8.
8. Kox LF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM, Kolk AH. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995;33:3225-33.

9. Park YK, Yu HK, Ryu SW, Bai GH. Rapid drug susceptibility testing for isoniazid and rifampicin by reverse hybridization assay. *Tuberc Respir Dis* 2003;55:440-8.
10. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *J Clin Microbiol* 2002;40:3810-3.
11. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Bouahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med* 2001;344:1294-303.
12. Karlson AG. The *in vitro* activity of ethambutol (dextro-2,2'-ethylenediimino-di-1-butanol) against tubercle bacilli and other microorganisms. *Am Rev Respir Dis* 1961;4:905-6.
13. Yajko DM, Kirihara J, Sanders C, Nassos P, Hadley WK. Antimicrobial synergism against *Mycobacterium avium* complex strains isolated from patients with acquired immune deficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1392-5.
14. Forbes M, Kuck NA, Peets EA. Effect of ethambutol on nucleic acid metabolism in *Mycobacterium smegmatis* and its reversal by polyamines and divalent cations. *J Bacteriol* 1965;89:1299-305.
15. Cheema S, Asotra S, Khuller GK. Ethambutol induced leakage of phospholipids in *Mycobacterium smegmatis*. *Int Res Commun Sys Med Sci Biochem* 1985;13:178-86.
16. Takayama K, Armstrong EL, Kunugi KA, Kilburn JO. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;16:240-2.
17. Paulin LG, Brander EE, Poso HJ. Specific inhibition of spermidine synthesis in Mycobacteria spp by the dextro isomer of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:157-9.
18. Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ, et al. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an Brabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11919-24.
19. Ahmad S, Mokaddas E, Jaber AA. Rapid detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by PCR-RFLP targeting *embB* codons 306 and 497 and *iniA* codon 501 mutations. *Mol Cell Probes* 2004;18:299-306.