

다제내성결핵 균주에서 Reverse Hybridization Assay를 이용한 Fluoroquinolone, Kanamycin 신속 내성 검사의 유용성

국립마산병원

박진수, 성낙문, 황수희, 전재현, 원영섭, 민진홍, 김천태, 강형석

Evaluation of Reverse Hybridization Assay for Detecting Fluoroquinolone and Kanamycin Resistance in Multidrug-Resistance *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates

Chinsu Park, M.D., Nackmoon Sung, Ph.D., Soohye Hwang, M.D., Ph.D., Jaehyun Jeon, M.D., Youngsub Won, M.D., Jinhong Min, M.D., Cheon Tae Kim, M.D., Ph.D., Hyungseok Kang, M.D.

Masan National Hospital, Changwon, Korea

Background: Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is an increasing public health problem and poses a serious threat to global TB control. Fluoroquinolone (FQ) and aminoglycoside (AG) are essential anti-TB drugs for MDR-TB treatment. REBA MTB-FQ[®] and REBA MTB-KM[®] (M&D, Wonju, Korea) were evaluated for rapid detection of FQ and kanamycin (KM) resistance in MDR-TB clinical isolates.

Methods: *M. tuberculosis* (n=67) were isolated and cultured from the sputum samples of MDR-TB patients for extracting DNA of the bacilli. Mutations in genes, *gyrA* and *rns*, that have been known to be associated with resistance to FQ and KM were analyzed using both REBA MTB-FQ[®] and REBA MTB-KM[®], respectively. The isolates were also utilized for a conventional phenotypic drug susceptibility test (DST) as the gold standard of FQ and KM resistance. The molecular and phenotypic DST results were compared.

Results: Sensitivity and specificity of REBA MTB-FQ[®] were 77 and 100%, respectively. Positive predictive value and negative predictive value of the assay were 100 and 95%, respectively, for FQ resistance. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of REBA MTB-KM[®] for detecting KM resistance were 66%, 94%, 70%, and 95%, respectively.

Conclusion: REBA MTB-FQ[®] and REBA MTB-KM[®] evaluated in this study showed excellent specificities as 100 and 94%, respectively. However, sensitivities of the assays were low. It is essential to increase sensitivity of the rapid drug resistance assays for appropriate MDR-TB treatment, suggesting further investigation to detect new or other mutation sites of the associated genes in *M. tuberculosis* is required.

Key Words: Tuberculosis; Fluoroquinolones; Kanamycin; Drug Resistance, Microbial; *Mycobacterium tuberculosis*; Mutation

서 론

다제내성 결핵은 전 세계적으로 심각한 문제가 되고 있으며, 다제내성 결핵환자의 발생률은 전 세계적으로 증가하고 있다. 2010년 세계보건기구(World Health Organization, WHO)의 조사에 의하면 2008년에는 전 세계적으로 440,000명이 다제내성 결핵을 앓고 있는 것으로 보고되었고¹ 우리나라의 경우 2004년 1년간 약제감수성 검사가 의

Address for correspondence: Hyungseok Kang, M.D.
Masan National Hospital, Gapo-dong, Masanhappo-gu,
Changwon 631-710, Korea
Phone: 82-55-249-3777, Fax: 82-55-246-1135
E-mail: 0120pcs@hanmail.net

Received: Oct, 20, 2011

Revised: Nov, 14, 2011

Accepted: Dec, 2, 2011

되던 11,939 결핵 균주 중 10.5% (n=1,298)가 다제내성 결핵으로 보고되는 등² 국내외적으로 다제내성 결핵은 심각한 사회적 문제이자 해결하기 어려운 문제라 하겠다. Bai 등²은 전국 내성 실태조사에서 신환자의 다제내성 결핵이 1994년 1.6%에서 2004년 2.69%로 의미 있게 증가하고 있음을 보고하였고, Jeon 등³도 우리나라의 국립병원에서 2001년 44.3%에서 2005년 57.6%로 증가하였음을 보고하였다.

일반적으로 폐결핵은 임상 증상, 방사선학적 소견, 객담 또는 기타 검체의 결핵균 도말 및 배양 검사로 진단되며 항결핵제 감수성 검사(drug susceptibility test, DST)의 결과를 토대로 다제내성 결핵을 진단하고 적절한 항결핵제를 선택하게 된다. 다제내성결핵의 치료에는 DST 결과에 따른 감수성 있는 약제의 선택이 중요하며, 약제내성 유무의 판별이 늦어져 적절한 항결핵치료가 지연될 경우 지속적인 내성균 감염원이 됨과 동시에 환자의 예후에도 악영향을 미치게 된다. Fluoroquinolone (FQ)계 항생제와 aminoglycoside (AG)계 항생제는 다제내성 결핵의 치료에 필수적이며 이러한 약제들에 대한 내성 여부가 예후를 결정하는 중요한 요소이다^{4,5}. 통상적인 고체배지를 이용한 약제감수성 검사 시 객담수집에서 감수성 결과가 보고되기까지 평균 3개월의 기간이 소요된다^{6,7}. 최근 분자생물학적 기법의 발달로 결핵균의 약제내성에 관여하는 여러 유전자들이 발견되었고, 이를 이용한 빠른 진단법이 기대되고 있는데 FQ의 경우 결핵균의 DNA 복제 및 전사를 담당하는 DNA gyrase 유전자인 *gyrA*의 점 돌연변이와 연관되어 있는 것으로 보고되고 있고⁸⁻¹⁰, Kanamycin (KM)의 경우 결핵균의 mRNA 복제 및 전사를 담당하는 16S rRNA 유전자(*rrs*)의 점 돌연변이와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다¹¹⁻¹⁴. 이를 근거로 *gyrA*와 *rrs* 유전자의 변이를 확인하여 FQ계 항생제와 AG계 항생제의 내성을 신속하게 검사할 수 있는 line probe assay와 같은 분자생물학적 약제감수성 검사(molecular DST)가 임상에서 많이 시도되고 있다⁸⁻¹⁴.

이에 저자들은 임상 균주를 이용하여 상용화된 REBA MTB-FQ[®], REBA MTB-KM[®] (M&D, Wonju, Korea)을 이용하여 *gyrA*와 *rrs* 유전자의 돌연변이를 검사하고 통상적인 항결핵제 감수성 검사(phenotypic DST) 결과를 기준으로 이 검사법의 유용성을 평가하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 검체

2009년 1월부터 2009년 5월까지 본원에서 치료받은 70명의 다제내성 결핵환자의 객담에서 분리되어 모아진 67개의 임상 균주를 이용하였다. 이들 균주는 inositol이 첨가된 10% skin milk에 -70°C 상태로 보관되어 있었으며 균주를 냉장온도에서 서서히 용해시킨 다음 3% Ogawa 배지에 접종하여 4주간 배양 후 연구에 사용하였다.

2. Lowenstein-Jenson 배지를 이용한 FQ과 KM에 대한 약제감수성 검사(phenotypic DST)

Ogawa 배지에서 자란 균주를 loop를 이용하여 떼어내어 Canetii 등¹⁵에 의해 기술되었던 절대농도법을 이용하여 McFarland 0.5 탁도에 맞추어 ofloxacin (OFX), KM이 포함된 Lowenstein-Jensen (L-J) 배지에 접종하였다(OFX $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$, KM $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$). 접종된 배지는 8주 동안 배양하여 매주 판독하였으며, 각 약제가 포함된 배지에서 결핵균이 자랐을 경우 내성으로 판별하였다.

3. *gyrA*와 *rrs* 유전자 변이 검사(molecular DST)

Ogawa 배지에서 자란 균주를 1 mL 증류수에 부유시키고, DNA extraction solution $100\ \mu\text{L}$ 를 넣고 와동(vortex)시킨 후 이를 10분간 100°C 로 중탕한 다음, 13,000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 그런 다음, 상층액 $3\ \mu\text{L}$ 를 중합효소 연쇄반응을 위한 template로 사용하였다. 각각 biotin과 tag polymerase가 표지된 REBA MTB-FQ[®] primer mixture (M&D)와 REBA MTB-KM[®] primer mixture (M&D)를 이용하여 PCR 증폭 후 증폭산물을 reverse blot hybridization kit (M&D)를 사용하여 여러 개의 wild type과 mutant type의 oligonucleotide와 교잡반응을 시키고 이를 streptavidine-alkaline phosphatase와 반응시켜 이 효소의 발색반응을 이용하여 *gyrA*와 *rrs* 유전자의 변이유무를 관찰하였다. REBA MTB-FQ[®] primer mixture (M&D)는 *gyrA* 88, 91, 94번의 돌연변이를 검출하며 REBA MTB-KM[®] primer mixture (M&D)는 *rrs* 1400, 1401, 1402, 1445, 1484 부위의 변이를 검출할 수 있다 (Figures 1, 2).

4. 감수성 검사방법간 결과 비교

Phenotypic DST와 molecular DST의 결과를 확인하고 이를 비교하여 각각의 약제별 민감도와 특이도, 양성 예측

치와 음성 예측치를 산출하였다. 민감도는 phenotypic DST에서 내성으로 나온 검체수 중에서 molecular DST에서 내성을 보인 검체의 비로 특이도는 phenotypic DST에서 감수성으로 나온 검체수 중에서 molecular DST에서

감수성을 보인 검체의 비로 구하였다. 양성 예측치는 molecular DST에서 내성으로 나온 검체수 중에서 phenotypic DST에서 내성을 보인 검체의 비로 음성 예측치는 molecular DST에서 감수성으로 나온 검체수 중에서 phenotypic DST에서 감수성을 보인 검체의 비로 구하였다.

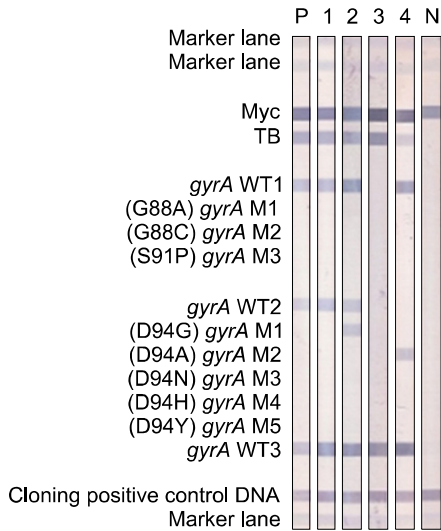


Figure 1. Representative patterns of susceptible and resistant strains using REBA MTB-FQ[®]. P: positive control (H37Rv); 1: no mutation; 2: no mutation+mutation (D94G); 3: mutation (del WT2); 4: mutation (D94A); N: negative control.

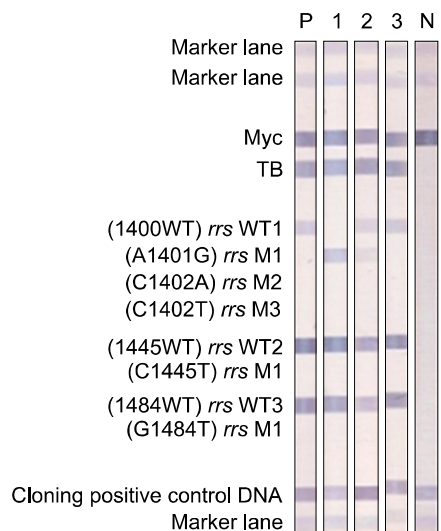


Figure 2. Representative patterns of susceptible and resistant strains using REBA MTB-KM[®]. P: positive control (H37Rv); 1: mutation (A1401G); 2: no mutation+mutation (A1401G); 3: no mutation; N: negative control.

결 과

1. OFX의 phenotypic DST와 gyrA 유전자의 변이 확인을 이용한 molecular DST 결과 비교

다제내성 결핵환자의 객담에서 분리된 67개의 균주에 대해 절대농도법을 이용하여 항결핵제 감수성 검사를 시행하였으며, 이를 gyrA에 대한 REBA MTB-FQ[®] 검사결과와 비교하였다. Phenotypic DST에서 OFX 감수성으로 판정된 54개의 균주는 REBA MTB-FQ[®]에서도 감수성을 나타내 특이도는 100%였다(Table 1). Phenotype DST에서 OFX 내성으로 판정된 13개의 균주 중 10개의 균주는 REBA MTB-FQ[®]에서도 내성을 나타내 민감도는 77%였다. Phenotype과 molecular DST에서 동시에 내성을 보여주는 10개의 균주 중, 6개의 균주에서 유전자변이가 관찰되었으며 4개의 균주에서는 wild type의 oligonucleotides에 유전자변이는 존재하였으나 특이 유전자변이는 관찰할 수 없었다. 유전자변이가 관찰된 6개의 균주에서 모두 균주 당 하나의 유전자변이를 보였고, 모두 gyrA의 94번째 염기서열의 변이가 관찰되었다(4개의 균주에서 아스파르트산[aspartic acid, Asp]이 글리신[glycine, Gly]으로 변이[D94G], 그리고 2개의 균주에서 알라닌[alanine, Ala]으로 변이[D94A]) (Table 1). OFX 내성을 검출하기 위한 REBA MTB-FQ[®]는 양성 예측율 100% (10/10), 음성 예측

Table 1. Comparative analysis of phenotypic and molecular DST of ofloxacin

	Phenotypic DST		Total
	R	S	
Molecular DST	R	10	10
	S	3	57
	Total	13	67
Sensitivity		77%	
Specificity		100%	
Positive predictive value		100%	
Negative predictive value		95%	

R: resistant; S: susceptible; DST: drug susceptibility test.

율 95% (54/57), 정확도 95.5% (64/67), 정밀도 100% (10/10)를 보였다(Table 1).

2. KM의 phenotypic DST와 *rrs* 유전자의 변이 확인을 이용한 molecular DST 결과 비교

항결핵제 감수성 검사와 *rrs* 유전자변이 검사를 시행했던 67개의 균주에 대해 검사결과를 분석하였다. Phenotypic DST상 57개의 균주가 KM 감수성으로 판정되었으며, 10개의 균주는 KM 내성으로 판정되었다. Phenotypic DST에서 감수성이었던 57개의 균주 중 54개는 REBA MTB-KM[®]을 이용한 *rrs* 유전자변이 검사에서 감수성으로 판정되었지만(특이도 94.7%), 3개의 균주에서 *rrs* 유전자변이가 관찰되었다. 즉, 2개의 균주에서 *rrs*의 1400 염기서열에서 deletion이 일어났으며 1개의 균주는 1401 염기서열에서 Ala이 Gly로 변이가 일어남을 관찰하였다. Phenotypic DST에서 내성으로 판정되었던 10개의 균주 중 3개의 균주에서는 *rrs* 유전자변이가 관찰되지 않았으며, 7개의 균주에서 *rrs* 유전자변이가 관찰되었다(민감도 70%). 유전자변이가 관찰된 7개의 균주 중, 5개의 균주에서 1401 염기서열에서 Ala가 Gly로, 그리고 2개의 균주에서는 1402 염기서열에서 시스테인(cysteine, Cys)이 Ala으로 변이되었다. 절대농도법으로 시행한 항결핵제 감수성 검사결과와 비교하여 보았을 때 REBA MTB-FQ[®]을 이용한 항결핵제 감수성 검사에서 양성 예측율 70% (7/10), 음성 예측율 95% (54/57), 정확도 91% (61/67), 정밀도 70% (7/10)로 나왔다(Table 2).

Table 2. Comparative analysis of phenotypic and molecular DST of kanamycin

	Phenotypic DST		Total
	R	S	
Molecular DST	R	7	10
	S	3	57
	Total	10	67
Sensitivity		70%	
Specificity		94.7%	
Positive predictive value		70%	
Negative predictive value		95%	

R: resistant; S: susceptible; DST: drug susceptibility test.

고찰

Bai 등², Jeon 등³의 보고에 따르면 국내의 다제내성 결핵환자의 수가 2000년 이후 꾸준히 증가함을 알 수 있고 다제내성 결핵은 오랜 치료기간과 낮은 완치율, 치료 중 발생하는 부작용과 치료비용의 증가 등의 특징으로 국가결핵관리체계의 중요한 과제이며 WHO는 약제내성 결핵의 실태 파악과 치료를 국가결핵관리체계에 포함시킬 것을 권고하고 있다. 다제내성 결핵환자의 적절한 처방구성을 위해서는 항결핵제에 대한 정확한 내성 검사가 필수적으로 요구되나, 기존의 약제 내성 검사는 결과를 얻기까지 평균 3개월이 소요되고 내성 여부에 대한 검사결과의 일관성 결여 등의 한계점이 있어^{6,7} 분자생물학적인 기법을 통한 신속 검사법이 다양하게 시도되고 있다. 1993년 Telenti 등¹⁶에 의해 rifampin 내성과 관련된 *tpoB* 유전자의 변이가 처음 기술된 이후, isoniazid 내성과 관련된 *katG*, *inhA*, *inhA* promoter, *ahpC*, *kasA*, *ndh* 유전자, ethambutol 내성과 관련된 *embB* 유전자, pyrazinimide 내성과 관련된 *pncA* 유전자, streptomycin 내성과 관련된 *rpsL*, *rrs* 유전자 등에 대한 연구가 이루어져 왔다^{17,18}.

Fluoroquinolone (FQ)은 광범위 항균력과 탁월한 효과로 호흡기와 요로감염증 등 여러 감염증에 사용되어 왔으며 호흡기감염균에 대한 우수한 효과로 폐렴의 1차 항생제치료로 사용되어 사용빈도가 늘어나게 되었다. FQ은 결핵균의 DNA복제 혹은 RNA전사 과정에서 DNA를 일시적으로 분리한 후 재연결하는 DNA gyrase에 작용하여 복제전사를 방해함으로써 항결핵효과를 나타내며 1980년대 OFX이 결핵에 대해 항균효과가 보고된 후 다제내성 결핵의 치료에도 사용되었다¹⁹. 그러나 FQ의 사용이 늘어남에 따라 FQ 내성 결핵 균주의 발생도 보고되었는데²⁰, 결핵균이 OFX에 내성을 획득하는 주 기전은 *gyrA*의 quinolone resistant determining region (QRDR)으로 불리는 유전자변이로 88, 90, 91, 94번의 아미노산 점 돌연변이가 주로 관찰되며 드물게 *gyrB*의 변이와 efflux pump를 coding하는 *lfiA* 유전자, pentapeptide protein *MfpA* 유전자 등의 변이도 관련이 있다^{8-10,21}. 본 연구에서 시행된 REBA MTB-FQ[®] (M&D)은 QRDR에 존재하는 *gyrA*의 88, 91, 94번의 돌연변이를 검출하는 방법이다. 본 연구에서는 OFX의 molecular DST는 phenotypic DST를 기준으로 민감도는 77%, 특이도는 100%로 평가되었으며 phenotypic DST에서 내성으로 나왔으나 molecular DST는 감수성으로 나온 3개의 검체는 *gyrA*의 변이가 관찰되지 않았던 것

으로 보아 밝혀지지 않은 변이 부위, 다른 기전에 의한 내성 획득 등에 대한 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

Aminoglycoside 제제는 광범위 항생제의 일종으로 결핵균의 리보솜과 결합하여 단백질합성을 저해하는 기전으로 살균작용을 보인다. 1944년 streptomycin이 소개된 이후로 항결핵치료에 중요한 역할을 해왔으며 이후 KM, amikacin, capreomycin, viomycin 등 여러 종류의 항생제가 개발되어 다제내성 결핵의 치료에 사용되어왔다⁴⁵. Streptomycin에 대한 내성획득 기전은 S12 리보솜 단백질의 *rpsL* 유전자변이 혹은 rRNA의 *rns* 유전자변이를 통해 약제의 표적이 되는 결핵균의 리보솜을 변형함으로써 획득되는데 KM에 대한 내성도 이와 유사하게 16S rRNA 유전자(*rns*)의 3' 부분의 A1401G 변이를 통해 주로 이루어지는 것으로 알려져 있고¹¹⁻¹⁴, 또 다른 기전으로 세포벽의 투과성, 약물 유출 펌프, 약물 격리와 약물 비활성화를 언급한 보고도 있다²². REBA MTB-KM[®] (M&D)을 이용한 본 연구의 결과에서는 KM의 molecular DST는 phenotypic DST에 비해 특이도는 94.7%로 비교적 높게 평가되었지만, 민감도는 70%로 평가되었다. 상대적으로 낮은 민감도는 연구에 사용된 REBA MTM-KM[®]이 16S rRNA 유전자(*rns*)의 1400, 1445, 1484, 1401, 1402 부위의 돌연변이만을 검출하는 방법이었으며, 실험에 포함된 대상 균주들의 표본수가 적었다는 점과 관련있을 것으로 생각된다.

현재 상용화된 신속 진단 검사 방법 중 가장 보고가 활발한 Genotype[®] MDRTBDRsl (HAIN Lifescience, German)의 결과와 비교했을 때 Hillemann 등²³이 2009년 보고한 결과에 따르면 63개의 다제내성 결핵 검체와 43개의 1차 항결핵제 감수성 검체에 대해 검사를 시행한 후 FQ에 대한 민감도와 특이도는 90.2%, 100%였고 AMK에 대한 민감도와 특이도는 83.3%, 100%로 본 검사보다 우수한 결과를 보였다.

분자생물학적으로 FQ 내성을 확인 하는 REBA MTB-FQ[®]과 Genotype[®] MDRTBDRsl방법은 모두 *gyrA* 유전자에서 변이에 의한 내성을 확인하는 방법으로, 같은 표적 유전자를 검출한다. 하지만, 아마도 유전자증폭 시 사용되는 primer의 차이, PCR 반응조건의 차이, 표적유전자의 변이와 결합하는 oligonucleotide의 차이, 그리고 연구에 적용된 검체의 수와 질의 차이 등에 의해 두 방법에서 민감도에 차이가 있음을 추측할 수 있다.

본 연구에서는 REBA MTM-FQ[®], REBA MTM-KM[®]을 이용하여 다제내성 임상 균주를 이용하여 FQ과 KM에 대해 phenotypic DST를 기준으로 한 molecular DST의 일치

율(민감도, 특이도)을 살펴보았으나 이미 모여진 임상 균주를 실험대상으로 하여 국내외 균주들을 대표하는 결론을 도출하기 어렵고 표본수가 적다는 한계점이 있다. 내성 결핵균의 발병률이 높은 지역사회에서 FQ, KM의 내성 여부를 신속하게 발견하고 적절한 처방을 구성하기 위해서는 신속내성 검사법의 민감도와 특이도의 향상이 필수적이며 이를 위해 보다 많은 수의 임상 균주를 대상으로 유전학적 변이 부위를 추가적으로 찾아내어 포함시켜야 하며 유전자변이 이외의 내성 발현 기전을 고려해야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Multidrug and extensively drug-resistant Tb (m/xdr-Tb): 2010 global report on surveillance and response. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
2. Bai GH, Park YK, Choi YW, Bai JI, Kim HJ, Chang CL, et al. Trend of anti-tuberculosis drug resistance in Korea, 1994-2004. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:571-6.
3. Jeon D, Shin D, Kang H, Sung N, Kweon K, Shin E, et al. Trend of multidrug and extensively drug resistant tuberculosis in a tuberculosis referral hospital, 2001 ~ 2005. *Tuberc Respir Dis* 2008;64:187-93.
4. Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:603-62.
5. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: emergency update 2008. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
6. Joh JS, Lee CH, Lee JE, Park YK, Bai GH, Kim EC, et al. The interval between initiation of anti-tuberculosis treatment in patients with culture-positive pulmonary tuberculosis and receipt of drug-susceptibility test results. *J Korean Med Sci* 2007;22:26-9.
7. Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J* 2005;25:564-9.
8. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:773-80.
9. Cheng AF, Yew WW, Chan EW, Chin ML, Hui MM, Chan RC. Multiplex PCR amplicon conformation analy-

- sis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:596-601.
10. Giannoni F, Iona E, Sementilli F, Brunori L, Pardini M, Migliori GB, et al. Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of *gyrA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2928-33.
 11. Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, et al. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1998;36:1220-5.
 12. Krüüner A, Jureen P, Levina K, Ghebremichael S, Hoffner S. Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2971-3.
 13. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3192-7.
 14. Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5064-8.
 15. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 1969;41:21-43.
 16. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
 17. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496-514.
 18. Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* 2004;9:975-94.
 19. Tsukamura M, Nakamura E, Yoshii S, Amano H. Therapeutic effect of a new antibacterial substance ofloxacin (DL8280) on pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:352-6.
 20. Sullivan EA, Kreiswirth BN, Palumbo L, Kapur V, Musser JM, Ebrahimzadeh A, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant tuberculosis in New York City. *Lancet* 1995;345:1148-50.
 21. Montero C, Mateu G, Rodriguez R, Takiff H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3387-92.
 22. Drlica K, Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem* 2003;3:249-82.
 23. Hillemann D, Rüschi-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2009;47:1767-72.