

결핵균에서 *gyrA* 유전자 돌연변이에 따른 Fluoroquinolone계 약제들의 교차내성

¹대한결핵협회 결핵연구원, ²성균관대학교 의과대학 내과학교실 삼성서울병원 호흡기내과, ³서울대학교 의과대학 미생물학교실, ⁴연세대학교 의과대학 미생물학교실
박영길¹, 박찬홍¹, 고원중², 권오정², 김범준³, 국운호³, 조상래⁴, 장철훈¹, 배길한¹

Cross Resistance of Fluoroquinolone Drugs on *gyrA* Gene Mutation in *Mycobacterium tuberculosis*

Young Kil Park, Ph.D., Chan Hong Park, B.S., Won-Jung Koh, M.D., O Jung Kwon, M.D., Bum Jun Kim, Ph.D., Yoon Hoh Kook, Ph.D., Sang Nae Cho, Ph.D. Chulhun Chang, M.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, Seoul National University College of Medicine, ⁴Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Fluoroquinolone drugs are an important anti-tuberculous agent for the treatment of multi-drug resistant tuberculosis. However, many drugs belonging to the fluoroquinolones have different cross resistance to each other.

Methods : Sixty-three ofloxacin (OFX) resistant and 10 pan-susceptible *M. tuberculosis* isolates were selected, and compared for their cross resistance using a proportion method on Lowenstein-Jensen media, containing ofloxacin (OFX), ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LVX), moxifloxacin (MXF), gatifloxacin (GAT) and sparfloxacin (SPX), at concentrations ranging from 0.5 to 3µg/ml. DNA extracted from the isolates was directly sequenced after amplifying from the *gyrA* and *gyrB* genes.

Results : The 63 OFX resistant *M. tuberculosis* isolates showed complete cross resistance to CIP, but only 90.5, 44.4, 36.5 and 46.0% to LVX, MXF, GAT, and to SPX, respectively. Fifty-one of the isolates (81.0%) had point mutations in codons 88, 90, 91 and 94 in *gyrA*, which are known to be correlated with OFX resistance. The Gly88Ala, Ala90Val and Asp94Ala mutations in *gyrA* showed a tendency to be susceptible to MXF, GAT and SPX. Only 4 isolates had mutations in the *gyrB* gene, which did not affect the OFX resistance.

Conclusion : About 60% of the OFX resistant *M. tuberculosis* isolates were susceptible to GAT, SPX and MXF. These fluoroquinolones may be useful in the treatment of TB patients showing OFX resistance.

(*Tuberc Respir Dis* 2005; 59: 250-256)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, Fluoroquinolones, Cross resistance, *gyrA*, Genotypes

서 론

Fluoroquinolone (FQ)계 항생제는 리팜핀 발견 이래 결핵환자 치료에 유효한 새로운 약제의 하나로 인정받고 있다¹⁻³. 이 약은 특히 리팜핀 내성을 포함한 다제내성균에 대한 중요한 치료약제의 하나로 권고

되고 있다⁴⁻⁸. 이러한 이유로 근래 다제내성 결핵환자에게 FQ계약제의 사용이 증가하고 있다. FQ계약제 중에서 ofloxacin (OFX)과 ciprofloxacin (CIP)은 정균 기능(bacteriostatic antimycobacterial activity)을 가지고 있고, 최근에 제3세대 FQ로 개발된 sparfloxacin (SPX), moxifloxacin (MXF)같은 FQ는 결핵균에 대해 살균작용을 한다. 현재 결핵연구원에서 실시되는 약제 감수성검사 항결핵약제에는 OFX이 포함되어 있고, OFX에서 내성이면 FQ계 다른 약제에도 교차내성이 있을 것으로 간주되었다. 그러나 국내에서도 이미 여러 가지 FQ계 약제들이 유통되고 있으므로 이 약제들 간의 결핵균에 대한 교차내성 정도를 정확히 파악할 필요가 대두되었다. 아울러 FQ계 약제의 내성은 *gyrA* 유전자의 돌연변이와 관계가 있으

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

Phone : 02-576-4981 Fax : 02-573-1914

E-mail : gbai@hotmail.com

Received : Jun. 9. 2005

Accepted : Aug. 16. 2005

므로⁹, 유전자 돌연변이에 따른 각 약제의 감수성이 차이가 있는지도 동시에 조사하였다.

대상 및 방법

1. 사용균주와 약제 감수성검사

2004년도에 결핵연구원으로 항결핵제에 대한 감수성검사가 의뢰된 균주중 OFX 2.0 µg/ml 농도로 함유된 Löwenstein-Jensen(LJ) 배지에서 배양시킨 후, 대조배지 상 균 집락 수와 비교하여 1%이상의 균이 발육하여 OFX 내성으로 판정한 63균주와 OFX 2.0 µg/ml 함유배지에서 감수성이었던 10균주를 무작위로 선정하여 본 실험에 사용하였다.

2. 교차내성 검사

FQ계 약제인 OFX (Sigma), CIP (한독약품), LVX (제일약품), MXF (바이엘코리아), SPX (삼아약품), GAT (한독약품)를 실험에 사용하였다. 사용 약제는 0.1 N NaOH에 1000µg/ml 농도로 용해하여 증류수로 희석하였다. 실험농도는 약제 비함유 대조배지를 포함하여, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml 등이 되도록 LJ 배지에 첨가하였다. OFX 내성판정은 대조배지상 발육균주 대비 2 µg/ml 함유 LJ 배지에서 1% 이상 균이 발육시를 내성을 하였고¹⁰, 나머지 약제들도 이 판정 기준에 준하였다.

3. PCR 및 염기서열분석

gyrA 유전자의 증폭을 위한 primer는 *gyrAF*: 5' GCCGAGACCATGGGCAACTA 3' (7533-7552, NC-000962), *gyrAR*: 5' TCAGCATCTCCATCGCCAAC 3 (7708-7728, NC000962)이었고, 그 산물의 크기는 196bp 이었다. *gyrB* 유전자의 증폭을 위한 primer는 *gyrBF*: 5' ACCGACATCGGTGGATTGC 3' (6536-6554, NC000962), *gyrBR*: 5' GCGGTTGTGCCAA AACACA 3' (6919-6938, NC000962)이었고 그 산물 크기는 403bp 이었다. 중합효소연쇄반응의annealing

온도는 65°C이었고, 용량은 100µl이었고, 성분은 10× Taq polymerase buffer 10µl, 2mM MgCl₂, 각 primer 20 pM, 2 mM의 4가지 dNTP, 1 U의 Taq polymerase (AP-Biotech, Uppsala, Sweden) 그리고 50-200 ng의 DNA가 포함되었다. 중합효소 연쇄반응은 Perkin-Elmer 480 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Norwalk, CT. 06859 USA) 제품을 사용하여 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 extension 반응으로는 72°C 10분을 실시하였다.

중합효소연쇄반응 산물은 정제(QIA quick PCR purification kit; QIAGEN)한 다음 BigDye Terminator sequencing kit 3.1와 ABI PRISM 377/3100 자동 염기서열 분석기 (Applied Biosystems/HITACHI, USA)을 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석은 하나의 산물에 대하여 forward와 reverse primer 2회 실시하였고, 의심스러운 균들은 반복 실험을 하였다.

결 과

1. 전약제 감수성균의 약제별 억제 농도

전 약제에 감수성인 10 균주의 각 약제의 농도별로 발육형태를 보면, OFX 0.5µg/ml에서 3균주가 발육 억제 되었고, 나머지 7주는 2µg/ml에서 균 발육이 억제되었다. CIP에서는 2균주가 0.5µg/ml에서 나머지 8균주는 2µg/ml에서 발육이 억제되었다. LVX에서는 6균주가 0.5µg/ml에서 나머지 4균주는 2µg/ml에서 억제되었다. 그러나 MXF, GAT, SPX에서는 10균주 모두가 0.5µg/ml에서 억제되었다. 따라서 MXF, GAT, SPX 세 약제에서는 다른 FQ계 약제보다 결핵균에 대한 발육억제 농도가 낮은 것임을 알 수 있었다.

2. *gyrA* 유전자 돌연변이에 따른 여러 퀴놀론계 약제의 교차 내성

OFX 내성균 63균주 중에서 *gyrA* 유전자에 돌연변

이를 나타낸 균주는 51균주(81.0%)였다. *gyrA* 유전자 돌연변이가 없는 나머지 12균주(19.0%) 중 LVX에서 감수성을 보인 균주는 4균주 이었고, MXF와 GAT에 감수성인 균주는 11균주이었으며, SPX에서 감수성을 보인 균주는 9균주이었다. 즉 *gyrA* 유전자 돌연변이가 없는 균주는 제3세대 FQ계 약제에는 대부분이 감수성을 보이는 경향이 있었다. *gyrA* 유전자 돌연변이를 가진 51균주 중에서 MXF에 감수성을 보인 균주는 24균주(47.1%)이었고, GAT에서 감수성은 29균주(56.9%)이었으며, SPX에서는 25균주(49.0%)가 감수성을 나타내었다. Gly88Ala 돌연변이인 1균주는 OFX와 CIP에서만 내성이었고 나머지 약제에서는 모두 감수성을 보였다. Ala90Val 돌연변이를 나타낸 12균주(19.0%)는 OFX, CIP, LVX에서 모두 교차내성을 나타냈으나, MXF, GAT, SPX에서는 GAT의 1균주를 제외하고는 모두 감수성을 나타내어 이 돌연변이는 제3세대 FQ 약제에 감수성을 보이는 경향을 나타내었다.

Ser91Pro 돌연변이는 6균주(9.5%)가 발견되었는데, OFX, CIP, LVX에서 모두 내성을 보였으며, MXF에서 1균주만이 감수성이었고, GAT에서는 3균주가 감수성이었으며, SPX에서는 4균주가 감수성을 나타내어, 제3세대 FQ 약제 간에도 다양한 내성 발현을 나타내었다.

94번 아미노산에서는 32균주(50.1%)가 돌연변이를 나타내었다. 32균주 중 Asp94Asn 돌연변이가 2균주 이었는데, 이 중 한 균주가 GAT에 감수성이었고, 나머지 약제에서는 모두 내성을 나타내었다. Asp94His

돌연변이 2균주는 모든 약제에서 교차내성을 나타내었다. Asp94Ala 돌연변이는 6균주가 발견되었는데, LVX에서는 1균주가 감수성이었고, MXF, GAT에서는 6균주 모두가 감수성을 나타내었으며, SPX에서는 5균주가 감수성을 나타내어 이 돌연변이는 제3세대 FQ 약제에서 감수성을 나타내는 경향을 보였다. Asp94Gly 돌연변이는 21개 균주에서 발견되었는데, OFX, CIP, LVX에서는 모두 내성을 보였고, MXF에서는 17균주가 내성을 보였으며, GAT에서는 14균주가 내성을 보였고, SPX에서는 18균주가 내성을 보여, 이 돌연변이는 제3세대 FQ계 약제에서도 내성을 나타내는 경향이였다. Asp94Tyr 돌연변이는 한 균주에서 발견되었는데 모든 약제에 교차내성을 보였다(Table 1).

전체적으로 OFX 내성균 63균주중에서 3균주는 2µg/ml까지 나머지 60균주는 3µg/ml까지 모두 자랐다. OFX 내성균주 63균주 중에서 2균주는 CIP 2 µg/ml까지 발육되었고, 나머지 61균주는 3µg/ml에서도 발육되어 63균주 모두 CIP에 내성을 나타내었다. 즉 OFX 내성균은 CIP에서 100.0% 교차내성을 나타내었다. OFX 내성균 중 LVX에서는 57균주가 내성을 나타내어 90.5% 교차내성을 보였다. 한편 제3세대 FQ계 약제인 MXF에서는 28균주가 내성을 보여 교차내성률은 44.4%이었고, GAT에서는 23 균주만이 내성을 나타내어 교차내성률이 36.5%에 불과하였고, SPX에서는 29균주가 내성을 보여 교차내성률은 46.0%이었다. 즉, OFX 내성균 중의 약 60%정도가 제3세대 FQ계 약제에 감수성을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Cross resistance of 63 OFX resistant strains to other fluoroquinolones depend on *gyrA* gene mutation

Mutation type	OFX		CIP		LVX		MXF		GAT		SPX	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
None	12	0	12	0	8	4	1	11	1	11	3	9
Gly88Ala	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
Ala90Val	12	0	12	0	12	0	0	12	1	11	0	12
Ser91Pro	6	0	6	0	6	0	5	1	3	3	2	4
Asp94Asn	2	0	2	0	2	0	2	0	1	1	2	0
Asp94His	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
Asp94Ala	6	0	6	0	5	1	0	6	0	6	1	5
Asp94Gly	21	0	21	0	21	0	17	4	14	9	18	3
Asp94Tyr	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
Total	63	0	63	0	57	6	28	35	23	40	29	34
	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%	90.5%	9.5%	44.4%	55.6%	36.5%	63.5%	46.0%	54.0%

R: resistant strains, S: susceptible strains

3. *gyrB* 유전자 돌연변이

63개의 OFX 내성균중에서 *gyrB* 유전자에 돌연변이를 보인 균주는 4균주(6.3%)에 불과하였다. 이들 4균주 중 2균주는 486번 아미노산에서 발생하였는데, 2균주 중 1균주는 염기서열 중 guanine(G)이 하나가 첨가 되었으며 이 균주는 *gyrA* 유전자의 Ser91Pro 돌연변이를 동시에 가지고 있었고, 다른 한 균주는 *gyrB* 유전자의 Phe486Tyr 돌연변이를 나타내었는데 이 균주는 *gyrA* 유전자의 Asp94His 돌연변이를 동시에 가지고 있었다. 4균주 중 2균주는 510번 아미노산에서 돌연변이를 보였는데, 그 중 한 균주는 Asn-510Thr 돌연변이였고, 다른 한 균주는 Asn510Asp 돌연변이를 보였다. 이 두 균주는 모두 *gyrA* 유전자에서는 돌연변이가 없었다. *gyrB*에서 돌연변이를 보인 4 균주는 모두 *gyrB*의 아미노산의 돌연변이가 없는 균주와 비교할 때, FQ계의 약제 내성에 영향을 주는 차이는 발견하지 못하였다.

고 찰

Fluoroquinolone (FQ)는 DNA 복제를 억제하는 효과로 광범위 항균제로 사용되고 있다. 지난 수십년간 호흡기 감염이 꾸준히 증가하므로써 일반 항생제의 내성 또한 증가하여왔다. 1980년대 중반 FQ의 하나인 OFX이 결핵에 대한 항균효과가 보고³된 이래, OFX는 다제내성결핵균(MDR) 치료를 위해 사용되어왔다. 그러나 OFX를 수개월 동안 지속적으로 사용하였는데도 균 음전이 되지 않을 경우, 결핵균은 OFX에도 내성으로 된다는 사실이 발견되었다¹¹. 이 후 OFX 내성균이라 하더라도 *in vitro* 시험에서 SPX가 보다 효과적이라는 사실도 발견된 바 있다^{12,13}. 1990년대에 두개의 C-8-methoxy FQ(MXF, GAT)가 상품화 되었고 이 약제들은 여러 가지 그람 양성균과 돌연변이가 있는 결핵균에서도 잘 작용하였다는 보고가 있다¹⁴. 그러나 세포배양이나 동물실험에서는 C-8-methoxy 화합물의 살균능력은 잘 드러나지 않았다¹⁵.

대부분의 세균은 DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV를 가지고 있으며 이는 FQ가 작용하는 부위

이다¹⁶. 이 두 효소는 DNA 복제 또는 RNA 전사 과정에서 이중 가닥의 DNA를 일시적으로 끊었다가 재연결하는 역할을 하는데, FQ는 이 효소에 붙어 복합체를 형성하여 DNA의 재연결을 방해 하므로써, 결국 DNA의 복제 및 전사를 방해하여 세균의 성장을 못하게 하는 것으로 알려졌다^{17,18}. 결핵균을 포함한 일부 세균들은 DNA topoisomerase IV가 없으므로 결핵균에서 FQ의 작용부위는 gyrase 뿐이다. 결핵균에서 대부분의 FQ 내성은 gyrase의 90번과 94번 아미노산의 돌연변이와 연관되어 있다⁹.

본 실험에서는 OFX 내성균 중에서 *gyrA* 유전자 돌연변이율이 81.0%로 나타났는데, 이 수치는 Cheng 등의 보고(32/55, 58.2%)보다는 높았으나¹⁹, Takiff 등의 보고(14/15, 93.3%)보다는 낮았다⁹.

gyrA 유전자 돌연변이를 나타낸 51균주 중에서 94번 아미노산에서 돌연변이를 일으킨 균주가 32균주(62.7%)로 가장 많았고, 90번 아미노산 돌연변이는 12균주(23.5%), 91번 아미노산 돌연변이는 6균주(11.8%), 88번 아미노산 돌연변이는 1균주(2.0%)이었다. Cheng 등의 보고에서는 94번 돌연변이가 71.9%, 90번 돌연변이가 15.6%, 91번 아미노산 돌연변이가 12.5%이었고¹⁹, Takiff 등의 보고에서도 94번 아미노산 돌연변이가 71.4%, 90번 돌연변이가 21.4%, 91번 아미노산 돌연변이가 7.1%로서, 돌연변이 분포율은 연구 결과들 간의 거의 일치하였다⁹.

이들 51균주 중에서 MXF에서 47.1%, GAT에서 56.9%, SPX에서는 49.0%의 균주가 감수성을 보였는데, Cheng 등의 보고에서는 돌연변이 균주 중 MXF에서는 84.4%, GAT와 SPX에서는 동일하게 59.4%가 감수성을 나타내었다¹⁹.

Ser95Thr 돌연변이는 OFX 내성균뿐만 아니라 OFX 감수성균에서도 모두 발생하였는데, 이는 다른 보고의 결과와 일치하였다¹⁹. 이 돌연변이는 *M. tuberculosis* H37Rv 균주와 소수 임상분리균을 제외한 대부분의 결핵균에 존재하며, OFX 내성에 영향을 주지는 않는 것으로 알려져 있으므로 *gyrA* 유전자 95번 아미노산은 Thr이 정상적이고 Ser이 돌연변이라고 보아야 할 것으로 판단된다.

본 실험에서 Ala90Val 돌연변이를 가진 12균주 중에서 1균주만 GAT에서 내성을 나타내고 나머지 모

든 균주는 제3세대 FQ계 약제인 SPX, GAT, MXF에서 감수성을 보였는데, Cheng 등의 보고에서도 이 돌연변이를 가진 균주가 모두 SPX, GAT, MXF에 감수성이었다¹⁹. Asp94Ala 돌연변이인 6균주 중에서도 1균주만 SPX에서 내성이었고, 나머지 균주 모두 제3세대 FQ계 약제에서 감수성이었는데, Cheng 등의 결과에서도 이 돌연변이 균주 모두가 MXF, GAT, SPX에서 감수성을 나타내었다¹⁹.

Ser91Pro 돌연변이에서는 6균주 중, SPX에서 4균주(66.7%)가 감수성, GAT에서는 3균주(50.0%)가 감수성, MXF에서는 1균주(16.7%)가 감수성을 보였는데, Cheng 등의 결과에서도 이 돌연변이를 보인 4균주 중 SPX에서 4균주(100.0%)가 감수성, GAT에서는 2균주(50.0%)가 감수성, MXF에서는 3균주(75.0%)가 감수성을 보여 다양한 교차내성 양상을 보였다¹⁹. 이 외에 다른 돌연변이는 본 실험에서도 다양한 교차내성을 보였지만 이러한 결과는 Cheng 등의 결과에서도 유사하였다¹⁹.

88번 아미노산 돌연변이는 1균주가 발견되었는데, 이 돌연변이 또한 다른 보고서에서도 발견된 바 있다²⁰.

본 실험에서도 GAT, MXF, SPX는 다른 FQ 보다 in vitro 시험에서 낮은 MIC를 보였는데, 이와같은 결과는 타 보고와도 일치하였으며²¹, 이 제3세대 FQ계 약제들은 in vivo 시험에서도 다른 FQ 보다 효과적인 것으로 보고되었다²²⁻²⁴.

Canetti 등의 결과에 따라²⁵ LJ 배지에서 2µg/ml 이상에서 균이 자란 경우를 내성으로 판정하였는데, 본 실험에서 OFX 2µg/ml에서는 자랐으나 3µg/ml에서 억제된 2균주는 모두 *gyrA* 돌연변이가 없었는데 이러한 균주를 가진 환자에 OFX 투여에 따른 효과가 있는지, 그리고 감수성균에서 타 약제보다 낮은 MIC를 가지고 있는 제3세대 FQ약제의 경우, 1µg/ml에서는 발육하지만 2µg/ml에서는 균 발육이 억제 되었을 경우, OFX와 동일하게 감수성으로 판정하였는데, 임상적인 결과와 일치하는지에 대한 연구가 향후 더 추가 되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

배 경 :

FQ계 약제는 다제내성 결핵환자들의 치료를 위한 주용 2차 항결핵약제의 하나이다. 그러나 FQ계 여러 약제들 간 교차내성 정도와 내성관련 유전자인 *gyrA*의 돌연변이간 관련성을 조사하게 되었다.

방 법 :

결핵균 중에서 OFX 내성인 63균주와 감수성인 10균주를 대상으로 Lowenstein-Jensen 배지에 CIP, LVX, MXF, GAT, SPX 등에 대한 교차내성을 조사하였다. 퀴놀론계 각 약제를 0.5-3µg/ml 농도로 첨가한 배지에서, 2µg/ml 이상에서 균이 발육한 경우를 내성으로 판정하였다. OFX 내성인 균주의 *gyrA* 및 *gyrB* 유전자의 돌연변이가 잘 발생하는 곳을 염기서열 분석하여 약제별로 그 교차내성 양상을 비교하였다.

결 과 :

OFX 내성인 63균주 모두가 CIP약제에서는 교차내성을 나타내었고, LVX에는 90.5%, MXF에는 44.4%, GAT에는 36.5%, SPX에는 46.0%가 교차내성을 보였다. 이들 내성균주의 81.0%가 *gyrA* 유전자에 돌연변이를 가지고 있었으며, 그 분포는 아미노산 88번, 90번, 91번, 94번에서 나타났다. 그 중에서도 Gly88Ala, Ala90Val, Asp94Ala 돌연변이는 제3세대 FQ계 약제인 MXF, GAT, SPX에 감수성을 나타내는 경향이 있었다. 한편 *gyrB* 유전자에서는 63개 OFX 내성균주 중 4균주만이 돌연변이를 나타내었으나, 이들과 *gyrB* 유전자내 돌연변이가 없는 균주들 사이에서 FQ의 내성에 관련해서 차이가 없었다.

결 론 :

OFX 내성균 중에서 약 60% 정도가 제3세대 FQ계 약제에서 감수성을 보였다. 따라서 이 들 약제에 대해서는 별도로 감수성검사를 실시하여 처방에 활용한다면, OFX 내성환자의 치료를 크게 향상시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Cambau E, Sougakoff W, Besson M, Truffot-Pernot C, Grosset J, Jarlier V. Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis* 1994;170:479-83.
2. Grosset JH. Treatment of tuberculosis in HIV infection. *Tuberc Lung Dis* 1992;73:378-83.
3. 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.
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. Crofton J, Chaulet P, Maher D, Grosset J, Harris W, Horne N, Iseman M, Watt B. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 1997.
6. Casal M, Ruiz P, Herreras A. Study of the *in vitro* susceptibility of *M. tuberculosis* to ofloxacin in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:588-91.
7. Hoffner SF, Gezelius I, Olsson-Liljequist B. *In vitro* activity of fluorinated quinolones and macrolides against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:885-8.
8. Yu MC, Suo J, Lin TP, Luh KT. *In vitro* activity of ofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Formos Med Assoc* 1997;96:13-6.
9. Takiff H, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, et al. Cloning and nucleotide sequence of the *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes, and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:773-80.
10. Kim SJ, Bai GH, Hong YP. Drug resistant tuberculosis in Korea, 1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:302-8.
11. 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.
12. 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;42:2978-84.
13. Xu C, Kreiswirth BN, Sreevatsan S, Musser JM, Drlica K. Fluoroquinolone resistance associated with specific *gyrA* mutations in clinical isolates of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1996;174:1127-30.
14. 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;44:2581-4.
15. Zhao BY, Pine R, Domagala J, Drlica K. Fluoroquinolone action against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: effects of a C8-methoxyl group on survival in liquid media and in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:661-6.
16. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377-92.
17. Hiasa H, Yousef DO, Mariani KJ. DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone DNA ternary complex. *J Biol Chem* 1996;271:26424-9.
18. Manes SH, Pruss GJ, Drlica K. Inhibition of RNA synthesis by oxolinic acid is unrelated to average DNA supercoiling. *J Bacteriol* 1983;155:420-3.
19. Cheng AF, Yew WW, Chan EW, Chin ML, Hui MM, Chan RC. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:596-601.
20. Perlman DC, el Sadr WM, Heifets LB, Nelson ET, Matts JP, Chirgwin K, et al. Susceptibility to levofloxacin of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with HIV-related tuberculosis and characterization of a strain with levofloxacin monoresistance. *AIDS* 1997;11:1473-8.
21. Kim BJ, Kang YS, Park SK. Activity of moxifloxacin against ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a study of cross-resistance between ofloxacin and moxifloxacin. *Tuberc Respir Dis* 2004;57:405-10.
22. Ji B, Lounis N, Maslo C, Truffot-Pernot C, Bonnafous P, Grosset J. *In vitro* and *in vivo* activities of moxifloxacin and cinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2066-9.

23. Alvarez-Freites E, Carter J, Cynamon MH. *In vitro* and *in vivo* activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1022-5.
 24. Ji B, Lounis N, Truffot-Pernoc C, Grosset J. *In vitro* and *in vivo* activities of levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1341-4.
 25. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler H, Menon N, 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.
-