

Chequerboard assay를 이용한 항결핵 병합 화학요법의 효과 예측

황현용, 배일권, 이유내, 정석훈

고신대학교 의과대학 진단검사의학과학교실

Effect Determination of Anti-tuberculosis Combination Chemotherapy By Chequerboard Assay

Hyun Yong Hwang, Il Kwon Bae, You-Nae Lee, Seok Hoon Jeong

Department of Laboratory Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background: To establish the method to evaluate the antimicrobial activity of multidrug regimen, to provide basic resources to establish the reasonable regimen for multidrug treatment strategy and to induce physician to use scientific regimen depending on results from antimicrobial susceptibility test rather than empirical strategy, we performed a chequerboard assay to decide synergy between 2nd-line drugs for multidrug-resistant tuberculosis.

Methods: After collection of the isolates showing resistance to rifampin(RFP) and isoniazid(INH), chequerboard assay was performed to decide synergy between 2nd-line drugs. Analysis of results to see which combination of drugs was effective to multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) isolates. For this purpose, fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated. A value of less than or equal to 0.5 is considered to be synergistic and a value of more than 2 is considered antagonistic.

Results: A combination of ofloxacin and prothionamide and a combination of ofloxacin and cycloserine showed a synergy in some MDR-TB isolates (Ofloxacin+prothionamide, FIC index=0.38, 0.50; ofloxacin+cycloserine, FIC index=0.45).

Conclusion: Antimicrobial susceptibility test using a chequerboard assay in MDR-TB is expected to be a promising tool for the patients who failed in treating TB with 1st and 2nd -line TB drugs however, an additional testing of the combinations in animal models or in actual clinical situations should be first done for warrant.

Key words : Chequerboard assay, MDR-TB, 2nd-line TB drug

서론

결핵은 하나의 원인균 감염에 의해 사망에 이를 수 있는 주요 질환들 중 하나이다.¹⁾ 최근 활동성 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis*에 1차 감염된 환자를 치료하기 위하여 흔히 사용되는 항결핵제인 isoniazid (INH)나 rifampin (RFP) 등에 대한 다제내성 결핵균의 보고가 증

가하고 있다.²⁻⁴⁾ 일차 결핵약제 치료에서 실패한 경우 완전히 새로운 약제로 구성된 2차 결핵약제로 치료 전략을 수립해야 하는 문제점이 있으며, 이러한 2차 결핵약제들은 매우 독성이 강하거나 고가여서 부수적인 문제점을 야기하고 있다.⁵⁾ 2차 결핵 약제의 경우 대부분 임상적 경험에 의한 약제선택이 이루어지며 특별히 결핵약제 내성 검사와 같은 약제 선택을 위한 부수적인 검사가 보편화 되어 있지 않다. 따라서 다제내성 결핵균의 효과적인 치료를 위해서는 빠른 감수성결과의 확인과 적절한 2차 약제 선택을 위한 검사 방법의 수립이 필요하다.

새로운 2차 약제에 의한 치료 전략을 수립하기 위해 정량적이면서 재현성 있는 결핵약제 감수성 검사법이 있

교신저자 : 정 석 훈
주소: 602-702, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 진단검사의학과학교실
TEL:051-990-6373, FAX: 051-990-3010
E-mail: kscpjsh@ns.kosinmed.or.kr

·연구비 수혜 : 이 논문은 국제결핵연구센터의 지원을 받아 수행된 연구임(ITRC/core-2006-005)

어야 하며 대부분 병합 화학요법을 사용하는 결핵에 있어서는 약제 병합에 대한 효과를 측정할 검사 방법의 확립이 가장 먼저 이루어져야 한다. 지금까지 개발된 여러 감수성 검사법 중에서 병합요법을 평가할 만한 표준화된 검사법은 없으며 실험실 단계에서 여러 연구자들에 의해 시도된 다양한 방법들이 소개되었다. 그 중에서 2차원적 chequerboard assay법은 결핵약제뿐 아니라 다양한 항생제에서 시도되었으나 실험이 어렵고 힘든 이유로 검사실에서 보편적으로 행해지고 있지는 않다.

2차원적 chequerboard assay 법은 여러 가지 항균제의 병합 사용시 나타나는 상승 효과 및 감쇄 효과를 평가하는 방법 중 하나이다. 두 가지 약제의 병합 요법에서 fractional inhibitory concentration (FIC)를 사용하는 2차원적 chequerboard assay의 해석 방법은 잘 수립되어 있다.^{5,6)} 그러나 이 방법을 이용한 결핵약제들의 병합요법에 관한 연구는 흔하지 않다. 최근 2005년 일본에서 *M. tuberculosis*에 대한 여러 항균제를 같이 사용하였을 때 시험관내 상승효과를 연구한 것 외에는 chequerboard assay 법을 이용한 결핵균에 대한 연구는 드물며 국내에서의 연구는 전무한 상태다.⁵⁾ 이에 저자들은 chequerboard assay 법을 이용하여 INH, RFP 등과 함께 사용하는 2차 약제의 상승효과를 알아보려고 하였다.

연구대상과 방법

1. 대상 균주 및 시험약제

결핵 약제 내성 균 8균주와 감수성균 1균주를 사용하였다(Table 1). INH에만 내성인 균, INH와 RFP에 내성인 균, INH와 capreomycin (CPM)에 내성인 균, INH, RIF 및 rifabutin (RFB)에 내성인 균, INH, RFP, streptomycin (SM), ethambutol (EMB) 및 pyrazinamide (PZA)에 내성인 균, INH, RFP, SM, EMB, RFB 및 prothionamide (PTH)에 내성인 균 각 1주와, INH, RFP, EMB, PZA, RFB, p-aminosalicylic acid (PAS) 및 ofloxacin (OFX)에 내성인 균 2주를 대상으로 하였다. 감수성 균주로 H37Rv를 사용하였다.

2차 결핵약제로 CPM(Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO, U.S.A.), SM(Sigma-Aldrich), PTH(Sigma-Aldrich), PAS(Sigma-Aldrich), cycloserin (CS) (Sigma-Aldrich) 및

OFX(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. OFX+SM, OFX+PTH, OFX+CPM, OFX+CS, 및 OFX+PAS의 병합 화학요법을 사용하여 시험 결핵 균주들을 시험하였다.

Table 1. Isolates number to be tested with chequerboard assay and their manifestation of antimicrobial agents showing resistance

Isolates No.	Antimicrobial agents showing resistance
1	INH
2	INH, CPM
3	INH, RFP
4	INH, RFP, RFB
5	INH, RFP, SM, EMB, PZA
6	INH, RFP, SM, EMB, PTH, RFB
7	INH, RFP, EMB, PZA, RFB, PAS, OFX
8	INH, RFP, EMB, PZA, RFB, PAS, OFX
H37Rv	Isolate susceptible to antimicrobial agents

Abbreviations: INH, isoniazid RFP, rifampin CPM, capreomycin; RFB, rifabutin SM, streptomycin EMB, ethambutol PZA, pyrazinamide PTH, prothionamide; PAS, p-aminosalicylic acid; OFX, ofloxacin

2. 실험 방법

1) Chequerboard assay를 이용한 antimicrobial susceptibility test 균을 Lowenstein-Jensen Media에 배양하였다. Chequerboard assay를 위해 x 축과 y 축으로 설정된 임의의 좌표에 예상 minimum inhibitory concentration (MIC)의 4~5 배 희석한 농도에서 2배 이상의 농도까지 단계적으로 희석한 각 시험 약제를 배지와 혼합하여 최종 배지를 제작하여 할당하였다(Fig 1). 이렇게 만들어진 배지들에 시험 균주를 접종하고 36℃에서 배양하였다. 3-5주 동안 관찰하여 약제에 의한 균주의 성장 및 억제력을 판단하였다. 결핵 2차 선택 약제로 흔히 사용되는 OFX를 기본으로 포함시키고 여기에 SM, PTH, CPM, CS 및 PAS를 각각 병합한 조합을 단계 희석하여 2차원적 chequerboard assay가 되도록 배지를 제작하였다. 이렇게 만들어진 5가지 종류의 배지에 감수성 균주와 결핵 약제 내성 8 균주를 각각 접종하였다. INH, RFP, CPM, RFB, SM, EMB, PZA, PTH, PAS, 및 OFX의 약제와 감수성 균주를 포함하여 이들 약제에 다양한 내성 유형을 나타내는 8 종류의 균주에서 감수성을 결정하였다.

2) Fractional inhibitory concentration index (FIC) 계산 및 해석

접종 후 균의 성장을 관찰하여 최종적으로 2차원적 chequerboard에서 각 좌표의 최소억제농도값을 구하고 이값을 FIC index의 계산에 사용하였다. FIC index는 'MIC[A] combination / MIC[A]alone + MIC[B] combination / MIC[B]alone'의 공식으로 계산하였고 가장 낮은 값의 FIC index를 구하여 0.5 이하인 경우 synergism, 1~2 사이의 값인 경우 indifference, 2보다 큰 값을 가지는 경우 antagonism으로 해석하였다.⁸⁻¹²⁾

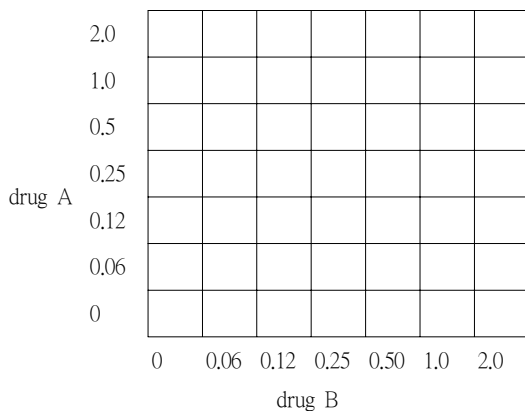


Fig 1. Combination of drug A and B in the chequerboard technique. Two drugs are diluted using expected MICs of the drugs being tested. The concentration of drugs here are expressed as multiples of MIC. Each square means an agar with assigned concentrations of two drugs.

결 과

1. OFX와 SM을 병합하여 각 균주에 적용한 결과 INH에만 내성인 결핵 균주에서 synergy가 있는 것으로 나타났으며(FIC index=0.50), 다른 균주들에서는 의미있는 반응을 나타내지 않았다(Table 2).

2. OFX와 PTH를 병합하여 각 균주에 적용한 결과 INH 및 CPM과 NH, RFP, SM, EMB, 및 PZA에 내성인 결핵 균주에서 synergy가 있는 것으로 나타났으며(FIC index=0.38, 0.50), 다른 균주들에서는 의미있는 반응을 나타내지 않았다(Table 2).

3. OFX와 CPM을 병합하여 각 균주에 적용한 결과 INH에만 내성인 결핵 균주에서 synergy가 있는 것으로

나타났으며(FIC index=0.50), 다른 균주들에서는 의미있는 반응을 나타내지 않았다(Table 2).

4. OFX와 CS을 병합하여 각 균주에 적용한 결과 INH와 CPM에 내성인 결핵 균주에서 synergy가 있는 것으로 나타났으며(FIC index=0.33), 다른 균주들에서는 의미있는 반응을 나타내지 않았다(Table 2).

5. OFX와 PAS을 병합하여 각 균주에 적용한 결과 INH에만 내성인 결핵 균주에서 synergy가 있는 것으로 나타났으며(FIC index=0.45), 다른 균주들에서는 의미있는 반응을 나타내지 않았다(Table 2).

Table 2. Fractional inhibitory concentration indices of antimicrobial agents determined by the two-dimensional chequerboard assay against 9 clinical isolates of *M. tuberculosis* when combined with second line drugs

Isolate No.	OFX combined with:				
	SM	PTH	CPM	CS	PAS
1	0.50	1.25	0.50	1.20	0.45
2	0.63	0.38	-	0.33	1.13
3	1.50	1.50	0.75	0.70	1.50
4	1.30	0.75	0.75	1.20	1.20
5	-*	0.50	0.75	1.25	0.45
6	-	-	1.50	1.50	0.70
7	1.50	1.50	1.50	1.50	-
8	1.13	0.75	1.13	1.13	-
Min.	0.50	0.38	0.50	0.33	0.45
Max.	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
H37Rv	0.75	0.75	0.75	1.25	0.45

*Accurate interpretation of FIC could not be made due to very high resistance to antimicrobial agents in the antimicrobial susceptibility tests. Abbreviations: INH, isoniazid; RFP, rifampin; CPM, capreomycin; RFB, rifabutin; SM, streptomycin; EMB, ethambutol; PZA, pyrazinamide; PTH, prothionamide; CS, cycloserine; PAS, p-aminosalicylic acid; OFX, ofloxacin

고 찰

Chequerboard assay는 바둑판과 같이 x축과 y축의 좌표에 해당하는 농도 조합의 배지를 제조하고 여기에 다제 내성 결핵균을 배양시켜 감수성을 시험하는 것으로 이론적으로 암시하듯이 실험 자체가 매우 복잡하며 힘든 작업이다. 따라서 이 방법의 효과가 입증되더라도 실제 검사실에서 평상적으로 사용하는 것은 힘들어 보인다. 그러나 지금까지 병합 요법을 제대로 평가할 만한 검사법

이 확립된 것이 없으므로 다각적인 시도가 필요하고 장비에 의한 자동화가 가능해지면 평상적인 검사로의 전환이 가능하므로 당장은 실험의 결과에 대한 정확한 평가가 중요할 것으로 사료된다.

대체적으로 두 약제의 병합 요법 시 모든 약물의 조합에서 상승효과가 일부 있는 것처럼 보였으나 OFX-CS와 OFX-PTH의 병합요법 시 일부 다제내성 결핵(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)에서 상승효과가 의미있게 관찰되었다. 2번 검체의 OFX-CPM 병합 시험, 5번, 6번 검체의 OFX-SM 병합 시험, 6번 검체의 OFX-PTH 병합 시험, 및 7번, 8번 검체의 OFX-PAS 병합 시험에서 예상 MIC와 매우 다른 배지의 성장이 관찰되어 x 축 혹은 y 축의 FIC index 값이 계산될 수가 없었다. 좌표상 값의 배열로 대체적인 양상은 추정할 수 있으나 정확한 수치로 환산이 되지 않으므로 최종 분석 자료에는 포함시키지 않았다. 2번 검체는 CPM에, 5번 검체는 SM에, 6번 검체는 SM과 PTH에 7번과 8번 검체는 OFX에 내성인 균주들로 chequerboard assay에서도 각 검체가 내성인 항생제에서 예상보다 훨씬 높은 MIC 양상을 나타내어 분석에 혼란을 초래한 것으로 사료된다.

Chequerboard assay에 의한 실험 결과의 정확성은 배지 제작 시 병합 약제의 비율의 정도와 매우 밀접한 연관이 있다. 세로축과 가로축에서 원점을 기준으로 약물의 농도가 진해지며 그 조합에 따른 결핵균의 성장을 판단하므로 제조되는 배지의 약물 농도에 해당하는 좌표의 눈금이 세밀하면 할수록 그 해석의 정확도가 커지는 것은 당연하다. 그러나 하나의 약물 조합과 하나의 균주를 위해 수십 개의 다양한 두 약물의 농도 조합으로 구성된 배지를 제조해야 하므로 앞서 언급하였듯이 무작정 조밀한 눈금의 농도 계단을 형성하여 배지를 일일이 만드는 것은 불가능하다. 따라서 일반적으로 예상 MIC의 4배 희석 정도에서 시작해서 2배 이상의 진한 농도까지 시험한다. 본 실험에 사용된 균주는 균주 번호가 증가할수록 다제내성 약제의 가짓수가 증가하는 것으로, 내성 약제 가짓수가 증가할수록 MIC를 예상하기가 어려우며 고도내성이 예상되는 경우 배지 제조 시 높은 약물 농도의 배지까지 포함시키는 것이 필요할 것으로 판단된다.

MDR-TB의 치료를 위해 몇 가지의 quinolone 제제가 개발되어 사용되었다.¹³⁻¹⁶⁾ Fluorquinolone 제제의 경우 단

일 요법만으로도 효과적이거나 이 경우 INH 혹은 RIF보다 우수하다고 볼 수 없으며 MDR-TB의 재치료에서 1차 선택 약제를 제외한 약제들과의 병합 요법에서 그 가치가 인정되고 있다.¹⁶⁻²¹⁾ 그러나 이미 OFX에 내성인 균주가 보고되고 있으며 MDR-TB의 절반 이상이 ciprofloxacin과 OFX에 내성으로 보고된 바 있다.²²⁾ 스페인에서는 일차 결핵 치료 약제에 감수성 혹은 내성인 균주들에서 OFX에 대한 MIC 값이 증가하는 추세가 보고되었다.²³⁾ 2004년 마산 국립결핵병원의 다제약제 내성 결핵 환자의 치료에 관한 연구에서 2차 결핵 약제에 대해 내성이 높은 경우 예후가 좋지 않았으며 이것을 결정짓는 유일한 위험인자는 OFX 내성이었다고 보고되었다.²⁴⁾

OFX와 병합하여 사용할 수 있는 약제는 개별 감수성 결과를 바탕으로 선택할 수 있다. 최선의 약제 조합은 개인에 따라 달라질 수 있겠으나 MDR-TB의 이차약제 선택 시 fluorquinolone 제제가 포함되는 것이 권장된다.²⁵⁻²⁷⁾ OFX/levofloxacin을 포함하는 병합화학 요법으로 치료한 MDR-TB 환자에서 81.0%가 치료되었다고 보고되었으며 공동(cavitation)이 있는 경우, 실험실에서 OFX에 내성인 경우 및 치료에 순응하지 않은 경우 예후가 불량하였다.²⁸⁾ 본 연구에서 OFX와 병합하여 투여된 2차 약제들에서 보여진 상승 효과는 균주에 따라 다양한 양상을 나타냈으며 특히, OFX에 내성인 균주의 FIC index 값이 7번과 8번 검체가 각각 평균 1.50과 1.27(0.75~1.50)로 다른 균주들에 비해 높은 값을 나타내었다. 또한 여러 약제에 동시에 내성인 6, 7, 및 8번 균주에서는 전혀 의미있는 상승 작용이 관찰되지 않았다. 그러나 3번과 4번 검체처럼 INH와 RFP 혹은 INH, RFP 및 RFB에 동시에 내성인 균주에서도 모두 상승 효과가 관찰되지 않아 반드시 동시에 내성인 항생제의 개수 양상만으로 판단할 수는 없을 것으로 생각된다.

항결핵 병합요법의 상승 작용은 효과적인 화학요법, 특히 다제내성 결핵의 치료에 매우 전도유망한 것으로 사료된다. 현재 국내에서는 chequerboard assay를 이용한 병합 화학 요법에서 상승 효과를 확인하고 보고하는 체계를 갖춘 곳은 알려져 있지 않다. 일차 치료에 실패한 환자에서 2차 약제를 선택할 때 일반적으로 표준화된 지침에 의한 경험적 혹은 단일 약제의 감수성 시험결과를 바탕으로 한 개인 맞춤형 치료에 의존한다. 따라서 다양

한 결핵 치료 약제에서 병합 요법에 의한 상승 효과가 확인된다면 약제의 선택에서 보다 합리적이며 임상적으로 최선의 결과를 기대할 수 있는 치료 전략을 세울 수 있다. 따라서 약물 병합에 대한 항균 작용의 유형 연구가 향후 더 이루어져야 할 것으로 생각되며 실험실의 in-vitro 결과가 in-vivo에서도 그대로 적용될 수 있는지 여부에 관한 연구가 추가로 필요할 것으로 사료된다.

결 론

OFX-CS, OFX-PTH의 병합요법 시 일부 MDR-TB 균에서 상승 효과가 관찰되었다. 동물 모델 혹은 실제 임상 시험에서 효과를 입증하여야 실제 환자에 적용시킬 수 있지만 항결핵 치료의 상승 효과는 효과적인 화학요법, 특히 MDR-TB의 치료에 매우 전도유망할 것으로 사료된다. 또한 chequerboard assay는 매우 방대한 양의 실험이 필요하므로 실용화의 측면에서 수작업으로 실험하는 것은 현실적으로 매우 힘들며 자동화된 장비의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Snider DE, La Montagne JR: The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 World Congress on Tuberculosis. *J Infect Dis* 169:1189-1196, 1994
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis at a hospital--New York City, 1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 42(22):427, 433-434, 1993
- Villarino ME, Geiter LJ, Simone PM: The multidrug-resistant tuberculosis challenge to public health efforts to control tuberculosis. *Public Health Rep* 107(6):616-625, 1992
- Bai GH, Park YK, Choi YW, Bai JI, Kim HJ, Chang CL, Lee JK, Kim SJ: Trend of anti-tuberculosis drug resistance in Korea, 1994-2004. *Int J Tuberc Lung Dis* 11(5):571-6, 2007
- Bhusal Y, Shiohira CM, Yamane N: Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 26(4):292-7, 2005
- Moody JA: Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: HD. Isenberg, Editor, *Clinical microbiology procedures handbook*, American Society for Microbiology, 1992, 5.18.1-5.18.28
- Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL: Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44:363-366, 2002
- Chou TC, Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* 22:27-55, 1984
- Prichard MN, Prichard LE, Shipman CJ: Strategic design and three-dimensional analysis of antiviral drug combinations. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 37:540-5, 1993
- Greco WR, Bravo G, Parsons JC: The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews* 47:331-85, 1995
- Lewis RE, Diekemab DJ, Messerc SA, Pfaller MA, Klepser ME: Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49:345-51, 2002
- Rand KH, Houck HJ, Brown P, Bennett D: Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 37:613-5, 1993
- Alangaden GJ, Lerner SA: The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clin Infect Dis* 25:1213-1221, 1997
- Jacobs MR: Activity of quinolones against mycobacteria. *Drugs* 58: 19-22, 1999
- N Rastogi KS, Bryskier GA, Devallois A: In vitro activities of levofloxacin used alone and in combination with first- and second-line antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40(7):1610-1616, 1996
- Walwaikar PP, Morye VK, Gawde AS: Ofloxacin in multidrug resistant tuberculosis. *J Indian Med Assoc* 101(3):210-212, 2003
- Tsukamura M: In vitro antituberculosis activity of a new antibacterial substance ofloxacin (DL 8280). *Am Rev Respir Dis* 131:348-351, 1985
- Collins CH, Uttley AHC: In-vitro susceptibility of mycobacteria to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 16:575-580, 1985
- Young LS, Berlin OGW, Inderlied CB: Activity of ciprofloxacin and other fluorinated quinolones against mycobacteria. *Am J Med* 82(suppl 4A):23-26, 1987
- Berlin OGW, Young LS, Bruckner DA: In-vitro activity of six fluorinated quinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 19:611-615, 1987
- Texier-Maugein J, Mormède M, Fourche J, Bébéar C: In vitro activity of four fluoroquinolones against eighty-six isolates of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol* 6:584-586, 1987
- 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*

5:546, 2001

23. Casal M, Ruiz P, Herreras A: Study of the in vitro susceptibility of *M. tuberculosis* to Ofloxacin in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 4:588, 2000
24. Park SK, Lee WC, Lee DH, Mitnick CD, Han L, Seung KJ: Self-administered, standardized regimens for multidrug-resistant tuberculosis in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(3):361-368, 2004
25. Iseman MD: Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *N Engl J Med* 329:784-791, 1993
26. Crofton J, Chaulet P, Maher D, et al: Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis WHO/TB/96.210 (rev 1). Geneva: World Health Organization, 1997
27. Chaulet P, Raviglione M, Bustreo F: Epidemiology, control and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Drugs* 52(suppl 2):103-108, 1996
28. 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* 117:744-751, 2000