

## ÇOK İLACA DİRENÇLİ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SUŞLARININ MİNÖR ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIĞININ SAPTANMASI

### THE RATES OF RESISTANCE TO SECOND-LINE DRUGS IN MULTIDRUG RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS

**Revasiye KAYALI\***, **Nilay ÇÖPLÜ\***, **İsmail CEYHAN\*\***, **Fatih OCAK\*\***,  
**Burak Ekrem ÇİTİL\***, **Berrin ESEN\***

**ÖZET:** Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) tedavisinde minör antitüberküloz ilaçlara gereksinim vardır ve bu nedenle ilaç duyarlılık testleri yapılmalıdır. Bu çalışmanın amacı, minör antitüberküloz ilaçlara karşı duyarlılık testlerinin kurulması, standardizasyonu ve direnç yüzdeleri hakkında veri elde etmektir. Minör ilaçlara karşı ilaç duyarlılık testleri, ülkenin çeşitli bölgelerinden toplanmış olan 50 ÇİD-*Mycobacterium tuberculosis* suşu için, proporsiyon yöntemiyle ve Lowenstein-Jensen besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Çalışılan ilaçlar etionamid, sikloserin, kanamisin, p-aminosalisilik asid (PAS), ofloksasin, tiasetazon ve kapreomisin olup direnç oranları sırasıyla %22, %8, %6, %6, %2, %2 ve %0 olarak belirlenmiştir. Çoklu ilaca direnç, suşların %8'inde saptanmıştır. Sonuç olarak, çok ilaca dirençli *M.tuberculosis* izolatlarının çalışılan minör ilaçlara karşı direnç oranlarının düşük olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Çok ilaca dirençli tüberküloz, duyarlılık testleri, minör antitüberküloz ilaçlar.

**ABSTRACT:** The treatment of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) requires the use of minor antituberculosis drugs, thus susceptibilities against these minor drugs should be performed. The aim of this study was to establish and standardize the susceptibility testing methods for minor antituberculosis drugs in this laboratory and to obtain data about the resistance rates. Drug susceptibility tests were performed by proportion method in Lowenstein-Jensen media for 50 MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates that have been collected from different regions of our country. Resistance rates to ethionamide, cycloserin, kanamycin, p-aminosalicylic acid, ofloxacin, thiacetazone, and capreomycin were found as 22%, 8%, 6%, 6%, 2%, 2%, and 0%, respectively. Multidrug resistance was observed in 8% of the isolates. As a result, the resistance rates of multidrug resistant *M.tuberculosis* strains against the tested minor antituberculosis drugs seem to be low in this study.

**Key words:** Multidrug resistant tuberculosis, susceptibility tests, minor antituberculosis drugs.

\* Refik Saydam Hıfızissihha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara.

\*\* Refik Saydam Hıfızissihha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı, Ankara.

## GİRİŞ

Tüberküloz bilinen en eski enfeksiyon hastalıklarından biri olup hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeler için hala sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Daha önemlisi, çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) hızla yayılmakta ve buna bağlı olarak epidemiyolojisi ve kontrol programlarının önemi artmaktadır<sup>1-7</sup>. ÇİD-TB tedavisinde, daha pahalı olan ve pek çok yan etkisi bulunan minör ilaçlara gereksinim duyulmaktadır<sup>2,8,9</sup>. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, klinisyenlere tedavi seçenekleri konusunda yol gösterici olabilmesi, veremle savaş programlarının düzenlenmesine katkıda bulunması ve uzun vadeli sürveyans çalışmalarına ışık tutabilmesi açısından minör ilaçlar için ilaç duyarlılık testlerinin yapılması gereklidir<sup>10</sup>.

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB), Tüberküloz Referans ve Araştırma Laboratuvarı (Tb.Ref.Lab.) *Mycobacterium tuberculosis*'de ilaç duyarlılık testlerini proporsiyon yöntemiyle ve Lowenstein-Jensen (L-J) besiyeri kullanarak majör ilaçlar için uygulamaktadır. Bu çalışmanın amacı minör ilaçlar için duyarlılık testlerini kurmak, standardize etmek ve direnç oranları hakkında veri sağlamaktır.

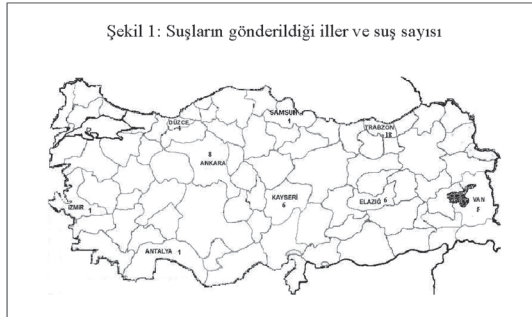
## GEREÇ ve YÖNTEM

**İlaç Duyarlılık Test Yöntemi:** Minör ilaçlara karşı duyarlılık L-J besiyerinde indirek proporsiyon yöntemiyle test edildi<sup>10</sup>.

**İzolatlar:** Çalışmaya, Ağustos 2002-Ağustos 2003 tarihleri arasında bölge tüberküloz laboratuvarları ve RSHMB Tb.Ref.Lab.'da izole edilen 50 ÇİD-*M.tuberculosis* suşu dahil edildi. İzolatların geldiği laboratuvarlar ve suş sayıları; Trabzon (n:18), Ankara (n:8), Van (n:6), Elazığ (n:6), Kayseri (n:4), Düzce (n:4), Samsun (n:1), İzmir (n:1) ve Antalya (n:1) idi (Şekil 1). Hastaların önceden aldıkları tedavi hakkında güvenilir bilgiler bulunmadığı için, tüm izolatlar toplam dirençli suş olarak değerlendirildi.

**Besiyerinin Hazırlanması:** Patates unu eklenmeden hazırlanmış olan L-J besiyerine çalışılacak olan antibiyotikler, kritik proporsiyona (KP) göre değişen kritik konsantrasyon (KK) değerinde olacak şekilde eklendi. Kullanılan antibiyotiklerin KP ve KK değerleri Tablo 1'de verildi. İlaçlı ve ilaçsız L-J besiyeri, burgu kapaklı

Şekil 1: Suşların gönderildiği iller ve suş sayısı



tüplere 7 ml hacimde dağıtıldı ve 80°C'de 45 dakika koagülatörde bekletildi. Besiyeri 4°C'de saklandı ve bir hafta içinde tüketildi<sup>10</sup>.

*Antibiyotikler:* Potens değeri bilinen sikloserin (CYC), etionamid (ETH), tiasetazon (TİA) ve p-aminosalisilik asit (PAS) RSHMB ilaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürlüğü'nden sağlandı, kapreosin sülfat (CAP, Sigma-21 K1537), ofloksasin (OFL, Sigma 51 K-1310) ve kanamisin sülfat (KAN, Amresco B 09-2812) ile beraber kullanıldı.

**Tablo I: Kullanılan Minör Antitüberküloz İlaçların Kritik Konsantrasyon (KK) ve Kritik Proporsiyon (KP) Değerleri<sup>10</sup>**

| İlaçlar* | %1 KP için KK (µg/mL) | %10 KP için KK (µg/mL) |
|----------|-----------------------|------------------------|
| PAS      | 0.5                   | 0.25                   |
| CYC      | 40                    | 30                     |
| ETH      | 30                    | 20                     |
| KAN      | 30                    | 20                     |
| CAP      | 40                    | 20                     |
| OFL      | 2                     | —                      |
| TIA      | —                     | 10.0                   |

\* PAS: p-aminosalisilik asit (PAS), CYC: sikloserin, ETH: etionamid, KAN: kanamisin, CAP: kapreomisin, OFL: ofloksasin, TIA: tiasetazon.

*İnokulüm:* İzolatların L-J'de 3-4 haftalık kültürlerinden BCG 1 mg/ml bulanıklığında süspansiyon hazırlandıktan sonra, 10<sup>-1</sup>'den 10<sup>-5</sup>'e kadar değişen 10 kat artan seri sulandırım yapıldı. İlaçlı ve ilaçsız L-J besiyerine 10<sup>-1</sup> ve 10<sup>-3</sup> sulandırımlardan 0,2 ml ekim yapılırken, ilaçsız besiyerine 10<sup>-5</sup> sulandırım da ekildi<sup>10-12</sup>.

*Değerlendirme:* Sonuçlar, izolatların 3., 4. ve 6. haftalarda ilaçlı ve ilaçsız L-J besiyerlerinde üremiş olan kolonileri sayılarak ve KK ile KP'u göz önünde tutularak değerlendirildi<sup>10</sup>.

*Kalite kontrolü:* Hazırlanan ilaçlı ve ilaçsız L-J besiyerleri sterilite kontrolü için 37°C'de bir gece inkübe edildi. H<sub>37</sub>Rv suşu her besiyeri hazırlanmada teste eklendi<sup>13</sup>. DSÖ'nün dökümanlarında da belirtildiği üzere ilk 10 suşun ilaç duyarlılık testi sırasında, doğal olarak oluşan dirençli mutantların sayısını saptayabilmek amacıyla standardize inokulüm süspansiyonunun 10<sup>-1</sup>'den 10<sup>-5</sup>'e kadar tüm sulandırımları besiyerine ekildi. Ayrıca yine ilk 10 suş için antibiyotiklerin, KK değerlerinin bir alt ve bir üst konsantrasyonlarını içerecek şekilde seri konsantrasyonları hazırlanarak minimum inhibitör konsantrasyonda oluşabilecek varyasyonlar açısından irdelendi<sup>10</sup>.

*İstatistiksel değerlendirme:* Bu amaçla SPSS 10,0 programı kullanılarak Ki-kare testi uygulandı.

## BULGULAR

Çalışılan 50 adet ÇİD-*M.tuberculosis* suşunun yedi minör ilaca karşı direnç oranları Tablo II'de sunulmuştur. Direnç oranlarının ETH için %22, diğerleri için ise %8'in altında kaldığı ve izolatların hiçbirisinin CAP'a dirençli olmadığı gözlenmiştir. Ki-kare testi ile değerlendirildiğinde, antibiyotiklere karşı direnç oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.000$   $X^2=53,05$ ). ETH ve CAP dışlandığında ise diğer beş antibiyotik arasında direnç oranları %2-8 arasında değişmekte olup, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0.178$ ,  $X^2=5.22$ ). Çoklu ilaç direnci olan 4 suş'un 3'ünde iki ilaca birden (biri CYC, diğeri ETH ya da PAS), birinde ise üç ilaca birden (TIA, OFL, PAS) direnç saptanmıştır.

Tablo II: Çok ilaca Dirençli *M.tuberculosis* (n: 50) Suşlarında Proporsiyon Yöntemiyle Minor Antitüberküloz İlaçlara Karşı Saptanan Direnç Oranları

| İlaçlar* | Dirençli suş<br>n (%) |
|----------|-----------------------|
| ETH      | 11 (22)               |
| CYC      | 4 (8)                 |
| KAN      | 3 (6)                 |
| PAS      | 3 (6)                 |
| OFL      | 2 (4)                 |
| TIA      | 1 (2)                 |
| CAP      | 0 (0)                 |

\* ETH: etionamid, CYC: sikloserin, KAN: kanamisin, PAS: p-aminosalisilik asid (PAS), OFL: ofloksasin, TIA: tiasetazon, CAP: kapreomisin.

## TARTIŞMA

Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) önemli bir halk sağlığı sorunudur, çünkü majör ilaçlar tedavide yetersiz kalmakta ve enfekte hastalar bu dirençli suşları topluma yaymaya devam etmektedir. ÇİD-TB olgularında tedaviye minör ilaçlar da eklenmelidir, ancak bu ilaçlar majör ilaçlara göre daha toksik ve daha az etkili olup, tedavi daha uzun sürmekte ve daha pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenlerle ÇİD-TB olgularının tedavisinde minör ilaçlara karşı duyarlılık testleri yapılarak uygun seçenekler kullanılmalıdır<sup>10,14</sup>.

Ülkemizde tüberküloz süveyans sisteminde verem savaş dispanserlerinin (VSD) önemli bir yeri vardır. Bilindiği gibi ülkenin değişik bölgelerine yayılmış olan 270 adet VSD'de fizik muayene, radyolojik ve mikroskopik inceleme olanaklarının yanı sıra ücretsiz tedavi ve takip hizmetleri de verilmektedir. Yine ülkenin değişik bölgelerine yayılmış olan 21 adet bölge tüberküloz laboratuvarında (BTL) VSD'lerin

gönderdiği balgam ve diğer klinik örneklerden kültür ve tanımlama yapılabilmekte, üç BTL tarafından da ilaç duyarlılık testleri uygulanabilmektedir. BTL'ler hem sonuçlarını hem de izolatlarını RSHMB Tb.Ref.Lab.'a göndermektedir. Bu sistem ülkedeki tüberküloz hastalarının önemli bir oranını kapsamaktadır. Ayrıca, üniversite, devlet hastaneleri ve özel hastaneler de tüberküloz hastalarına bakabilmekte ve bir kısmı yine VSD ağına ve BTL'na ya da RSHMB Tb.Ref.Lab.'a tanı veya tedavinin herhangi bir aşamasında gönderebilmektedir. Ülkemizde minör ilaç duyarlılığıyla ilgili bazı çalışmalar yapılmakla beraber çoğunluğunda bölgesel veriler sunulmuştur<sup>15-23</sup>. Bu çalışmaya, ülkenin çeşitli bölgelerindeki BTL'dan gönderilen suşların dahil edilmesi, sonuçların kısmen de olsa ülke genelini yansıtabileceğini göstermektedir. Verem Savaş Daire Başkanlığı'nın verilerine göre 2002 yılı için adı geçen illerde (Trabzon, Ankara, Van, Elazığ, Kayseri, Düzce, Samsun, İzmir, Antalya) tüberküloz insidansı (1/100.000) sırasıyla 18.05, 14.22, 14.36, 27.04, 13.96, 44.87, 34.07, 33.52 ve 17.33 olarak belirtilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü, minör ilaç duyarlılık testlerinin güvenilir olması için, bu yöntemlerin majör ilaç duyarlılık testlerinde deneyimi olan laboratuvarlar tarafından yapılmasını önermektedir<sup>10</sup>. Bundan başka, Amerikan Toraks Derneği tarafından minör ilaç duyarlılık testlerinin yalnızca referans laboratuvarlarca yapılması önerilmektedir<sup>14</sup>. Major ilaç duyarlılık testlerini 1960'lardan bu yana uygulayan ve ülkenin referans laboratuvarı olan RSHMB Tb.Ref.Lab.'nın minör ilaç duyarlılık testlerini de kurması ve standardize etmesi gereklidir. Bu amaçla başlatılan çalışmamızda, DSÖ'nin önerileri doğrultusunda L-J besiyeri kullanılarak yapılan proporsiyon yöntemi seçilmiştir<sup>10</sup>. Bu testlerde sonuçların elde edilme süresi hesaplandığında; klinik örnek ya da kültür transportunun bir gün aldığı ve örneğin laboratuara gelmesinden minör ilaç duyarlılık test sonuçlarının çıkmasına kadar geçen sürenin 11-16 hafta arasında değiştiği görülmektedir. Bu sürenin 3-4 haftasını kültür, 4-6 haftasını majör ilaç duyarlılık testleri ve yine 4-6 haftasını minör ilaç duyarlılık testleri almaktadır.

Bulgularımıza göre minör ilaçlar, *M.tuberculosis* izolatlarının %22'sinin direnç gösterdiği ETH dışında oldukça etkili bulunmuştur. ETH, izoniasid'in (INH) yapısal bir analogu olup mikolik asit biyosentezini inhibe etmektedir. INH ve ETH arasında *inh-A* geninde oluşabilen mutasyonlar nedeniyle ko-resistans gelişebileceği bildirilmiştir<sup>24,25</sup>. Çalışılan ÇİD-M.tuberculosis suşlarının INH direnç mekanizmaları saptanmamıştır, ancak ETH direncinin göreceli olarak yüksek bulunmasının INH dirençli olan bu suşlarda ko-resistanstan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Bu yüksek direnç oranı, direncin daha da artmaması için uygun politikaların geliştirilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Çoklu ilaç direnci de yine bu anlamda üzerinde durulması gereken bir bulgudur.

Yurdumuzda ya da yurtdışında yapılmış olan diğer çalışmaların bulguları Tablo III'de sunulmaktadır. Bu bulgular irdelendiğinde, bazı sonuçların bizim verilerimizle uyumlu olduğu, diğerlerinin ise daha yüksek direnç oranları belirttiği gözlenmiştir<sup>16,17,19-21,26-29</sup>. Bu çalışmalarda pek çok değişik yöntem ve besiyerinin kullanılmış olduğu, çalışma grubunun da yine değişkenlik gösterdiği ve bu nedenlerle karşılaştırma yapmanın güç olduğu düşünülmüştür.

Tablo III: Yurt İçi ve Dışında Yapılmış Olan Bazı Minör İlaç Duyarlılık Çalışmalarının Sonuçları (%)

| Tarih (Kaynak no) | Suş sayısı | ETH   | CYC   | OFL    | KAN      | CAP      | PAS | TIA |
|-------------------|------------|-------|-------|--------|----------|----------|-----|-----|
| 1982-1991 (16)    | 683        |       |       |        |          |          |     | 9   |
| 1992-1999 (16)    | 863        |       |       |        |          |          |     | 7   |
| 2000 (17)*        | 32         | 65.6; | 18.7; |        | 9.3; 9.3 | 2.5; 6.2 |     |     |
|                   |            | 56.2  | 15.6  |        |          |          |     |     |
| 2003 (17)         | 64         | 67.2  | 100   | 17.2** |          | 51.6     |     |     |
| 2002 (20)         | 75         | 38.6  |       | 0      | 0        | 1.3      | 4   |     |
| 1993 (21)         | 100        |       |       | 0      |          |          |     |     |
| 2001 (26)         | 72         |       |       |        | 49       |          |     |     |
| 1997 (27)         | 54         |       |       |        | 31       | 31       |     |     |
| 1999 (28)***      | 242        | 23.1  | 7.85  | 8.26   | 14       | 7.85     |     |     |
| 2001 (29)         | 453        |       |       |        | 3.5      |          |     |     |

\* Duyarlılık test sonuçlarını değerlendirmek için iki ayrı KK ve KP kullanılmıştır.

\*\* Ofloksasin yerine siprofloksasin çalışılmıştır.

\*\*\* Bu sonuçlar ÇİD-TB suşlarını içeren çalışma grubunun verileridir.

Bu çalışma sonucunda RSHMB Tüberküloz Referans laboratuvarı, minör ilaç duyarlılık testlerini standardize etmiş ve rutin olarak çalışmaya başlamıştır. Bu testlerin bulguları hem ÇİD-TB hastalarının tedavisi açısından yol gösterici olacaktır, hem de minör ilaçlarda mevcut direnç oranlarının değerlendirilmesine ve zaman içinde oluşacak değişimlerin hızla saptanarak gereken önlemlerin alınmasına katkı sağlayacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Guidelines for the Management of Drug Resistant Tuberculosis. WHO/TB/96.210/Rev.
2. Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. New Engl J Med 1993; 328: 527-32.
3. Jacobs RF. Multiple-drug-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis 1994 ; 19: 1-10.
4. Kent JH. The epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis in the United States. Med Clin North Am 1993; 77: 1391-409.
5. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburg RC, Good CR. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? J Clin Microbiol 1993 ; 31: 767-70.
6. Riley WL. Drug-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis 1993; 17 (Suppl 2): 442-6.
7. Schwoebel V, Lambregts-van Weezenbeek CSB, Moro ML, et al. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. Eur Respir J 2000; 15: 364-71.
8. Iseman MD. Treatment of multidrug resistant tuberculosis. N Engl J Med 1993; 329: 784-91.
9. Tahaoğlu K, Törün T, Sevim T, et al. The treatment of multidrug resistant tuberculosis in Turkey. N Engl J Med 2001; 345: 170-4.
10. Guidelines for Drug Susceptibility Testing for Second-line Antituberculosis Drugs for DOTS-plus. WHO/CDS/TB/2001.288.

11. Howard BJ, Klaas II J, Robin SJ, Weissfeld AS, Tilton RC. Clinical and Pathogenic Microbiology, pp: 877-978.1987. CV Mosby Company, USA.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* and other aerobic *Actinomycetes*; Tentative Standard M24-T2. 2<sup>nd</sup> ed. 2002, Pa.
13. Hindler J. Antimicrobial susceptibility testing, p: 5.13. In: Isenberg HD (ed), Clinical Microbiology Procedures Handbook. 1993, ASM, Washington DC.
14. 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.
15. Çiçek SC, Çavuşoğlu C, Burhanoğlu D, Özkalay N, Badak ZF, Bilgiç A. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* strains to first-line and second-line antituberculosis drugs in Ege University hospital. Türk J Med Sci 2001; 31: 395-400.
16. Kart L, Altın R, Tor M, et al. Antituberculosis drug resistance patterns in two regions of Turkey: a retrospective analysis. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2002; 1: 6-13.
17. Oğuz VA, Akbal H, Sarıbaş S ve ark. Edinsel çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının majör ve minör antitüberküloz ilaçlara duyarlılığı. İnfeks Derg 2000; 14: 383-6.
18. Ilgazlı A, Yıldız F, Özkarakas O ve ark. Akciğer tüberkülozunda ilaç direnci: Türkiye'de bir sanayi kenti Kocaeli. Solunum Hastalıkları 1999; 10: 225-30.
19. Tansel O, Yüksel P, Kuloğlu F, Akata F. Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* sekonder antitüberküloz ilaçlara duyarlılık sonuçları. İnfeks Derg 2003; 17: 307-11.
20. Şatana D, Yeğenoğlu Y. Çoğul ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi suşlarının sekonder ilaçlara duyarlılığının BACTEC ve agar proporsiyon yöntemleri ile araştırılması, s: 198. 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 31 Ekim - 2 Kasım 2002, Abant. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No: 45.
21. Zeyfikli Z, Ünsal M, Yener O, Dursun G, Yalçın AN. *Mycobacterium tuberculosis*'in ofloksasin ve siprofloksasine in-vitro primer direnci. İnfeks Derg 1994; 8: 99-102.
22. Tümer F, Savran Ş. Memleketimizde 1992-1993 yıllarında tüberküloz ilaçlarına direnç durumu. 20. Türk Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi. 7-9 Nisan 1994, Antalya. Kongre Kitabı, s: 380-386.
23. Bakıcı MZ, Bakır M, Yalçın AN. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloid ilaçlara direnç durumları. İnfeks Derg 1993; 7: 91-3 .
24. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. Emerg Infect Dis 1998; 4: 195-209.
25. Ramaswamy S, Musser MJ. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber Lung Dis 1998; 79: 3-29.
26. Bastian I, Rigouts S, Palomino CJ, Portaels F. Kanamycin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using *Mycobacterium* Growth Indicator Tube and a colorimetric method. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1934-6.
27. Ho ILY, Chan Y, Cheng BFA. In vitro activities of aminoglycoside-aminocyclitols against *Mycobacteria*. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 27-32.
28. Pryffer EG, Bonato AD, Ebrahimzadeh A, et al. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. J Clin Microbiol 1999; 37: 3179-86.
29. Wang DP, Lin SR. Drug resistant tuberculosis in Taipei, 1996-1999. Am J Infect Control 2001; 29: 41-7.