

原 著

結核菌の *rpsL* 遺伝子内変異と  
ストレプトマイシン感受性の検討福田美穂・古賀宏延・大野秀明  
小川和彦・楊兵・宮本潤子  
朝野和典・河野茂

長崎大学医学部第二内科

RELATIONSHIP BETWEEN STREPTOMYCIN SUSCEPTIBILITY AND *rpsL*  
MUTATIONS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINSMiho FUKUDA\*, Hironobu KOGA, Hideaki OHNO,  
Kazuhiko OGAWA, Bing YANG, Junko MIYAMOTO,  
Kazunori TOMONO, and Shigeru KOHNO

The relationship between streptomycin (SM) susceptibility and *rpsL* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains was studied. Of 18 clinically isolated SM-resistant *M. tuberculosis* strains, mutation was suspected in 9 strains (50%) with SM MICs of  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$  by PCR-single strand conformation polymorphism targeting *rpsL* gene. On the other hand, using PCR-direct sequence method, amino acid substitution caused by single nucleotide point mutation in *rpsL* gene was demonstrated in 11 out of 18 strains (61%). The same amino acid substitution at codon 43 (Lys $\rightarrow$ Arg) was observed in all 11 strains with SM MICs of  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ . In addition, PCR products obtained from these 11 strains could not be cut by a restriction enzyme, *Mbo* II, while H37Rv strain and the other 32 strains with SM MICs of  $< 256 \mu\text{g/ml}$  were cut into 2 fragments. In conclusion, our results suggest that highly SM-resistant *M. tuberculosis* strains with MICs of  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$  could be rapidly and easily detected by the restriction enzymatic method.

**Key words** : Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Streptomycin, *rpsL* gene, Point mutation

キーワード : 薬剤耐性結核菌, ストレプトマイシン, *rpsL* 遺伝子, 点変異

## はじめに

結核症の診断に関しては、近年の分子生物学的技法の応用により、きわめて迅速な菌の遺伝子検出が可能となっ

た<sup>1)2)</sup>。また、結核菌の薬剤耐性の判定に関しても、従来の1~2カ月を要する検査法に代わって、種々の迅速な方法が考案されている<sup>3)~10)</sup>。しかし、これらの方法はすべて臨床検体から菌が分離培養された場合にのみ

別刷り請求先：  
福田美穂  
長崎大学医学部第二内科  
〒852 長崎県長崎市坂本1-7-1

\* From the Second Department of Internal Medicine,  
Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1  
Sakamoto, Nagasaki 852 Japan.  
(Received 12 May 1977/Accepted 22 Jul. 1997)

可能であり、たとえば塗抹や遺伝子診断が陽性でも培養陰性の検体では施行できない。一方、薬剤耐性に関与する遺伝子がしだいに解明されるようになり、isoniazid (INH)<sup>11)12)</sup> や rifampicin (RFP)<sup>13)</sup> に対する耐性遺伝子の変異がすでに報告されている。当教室の大野らも、RFP に対する *rpoB* 遺伝子の変異の種類と最小発育阻止濃度 (MIC) との関係を検討し、ある一定の関連性を報告した<sup>14)15)</sup>。

今回私たちは、同様の検討を streptomycin (SM) 耐性遺伝子に関して行い、その変異と MIC との関係、さらに制限酵素切断による変異の迅速な検出法を検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株

当科および関連施設において、臨床経過や各施設の耐性検査から薬剤耐性が疑われた臨床分離結核菌41株を対象とした。また、コントロール菌株としては結核菌標準株 H37Rv を用いた。

### 2. 供試薬剤

明治製菓株式会社 (東京) より分与された SM を用いた。

### 3. 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査は既に報告した微量液体希釈法により行った<sup>14)</sup>。その概略は、小川培地上の結核菌の数コロニーを ADC を添加した Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, USA) に接種して 37°C で約 1 週間培養し、濁度が McFarland No.0.5 (結核菌の約 10<sup>6</sup> CFU/ml に相当) になるように菌液を調整した。SM は滅菌蒸留水に溶解して 0.5 μg/ml から 4096 μg/ml までの濃度の 2 倍階段希釈系列を作製し、96 穴のマイクロプレート (Cell Wells 25850; Corning Glass Works, Corning, New York) に各々 100 μl ずつ分注した。さらに各ウェルに前記の調製菌液を 100 μl ずつを加えて 37°C で培養した。したがって、SM の最終濃度は 0.25 μg/ml から 2048 μg/ml となった。MIC の判定は、培養開始後 7 日目と 10 日目にプレートを観察し、薬剤非添加のウェルに十分な結核菌の増殖を認めた時点で、菌の発育が認められないウェルにおける SM の最低濃度を MIC とした。また同時に硝酸塩還元試験を行って菌増殖の有無を確認した。

### 4. DNA 抽出法と PCR 法

小川培地上の結核菌のコロニーを約 1/2 白金耳採取し、すでに報告したフェノール、クロロホルム法にて DNA を抽出し<sup>1)14)</sup>、10ng を 1 回分の PCR に使用した。

PCR は 2 種類の遺伝子を標的として行った。1 つは供試菌株が結核菌であることを証明するための PCR で、

Sjöbring らが報告した結核菌の 38kDa 蛋白抗原 (protein antigen b, Pab) をコードする遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いて行った<sup>1)</sup>。また、SM 耐性遺伝子検出のための PCR は、Meier ら<sup>16)</sup> が報告した結核菌の ribosomal protein S12 をコードする遺伝子 (*rpsL*) の塩基配列を参考にして、私たちがデザインした 360bp を増幅するプライマー (RPS1:5'-ATGCCAACCATCCAGCAGCT-3', RPS2:5'-CTTAGCCG CCGTAACGGCTGC-3') を用いて行った。すべてのプライマーは DNA synthesizer (Model 380B, Applied Bio systems, Foster City, California) で合成し、PCR には DNA thermal cycler (PJ 2000 Perkin-Elmer Corp., Foster City, California) を使用した。反応条件は denaturation が 94°C 1 分、annealing が 60°C 1 分、extension が 72°C 1 分で、40 サイクル反応させた。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲル (SEAKEM ME agarose, FMC BioProducts, Rockland) 内で電気泳動後、ethidium bromide (EB) 染色により、それぞれ Pab 遺伝子は 419bp、*rpsL* 遺伝子は 360bp のバンドの有無を確認した。

### 5. *rpsL* 遺伝子内変異の検出

*rpsL* 遺伝子内変異の検出のために、PCR-single strand conformation polymorphysm (PCR-SSCP) 法、PCR-direct sequencing 法、および制限酵素切断による判定法の 3 種類の検査を行い、標準株 H37Rv と臨床分離 41 株の検査結果を比較検討した。

#### 1) PCR-SSCP 法による変異の検出

PCR-SSCP 法は、先に述べた *rpsL* 遺伝子から得られた PCR 産物 (360bp) を 1 μl 採取し、4 μl の変性液 (20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 95% formamide, 0.05% xylene cyanol) とともに 95°C で 5 分間加温することにより変性させ、その後直ちに氷冷した。変性した PCR 産物は Phastgel Homogeneous 20 を用いた PhastSystem (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) により電気泳動を行い、次いで PhastSystem Development Technique に従って銀染色を施行した。バンドのパターンは H37Rv をコントロールとし、供試菌株のバンドと比較して変異の有無を判定した。

#### 2) PCR-direct sequencing 法による変異の検出

PCR 産物の塩基配列決定には、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit (Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Corp.) を用いた。具体的には、Suprec-02 (宝酒造株式会社、滋賀) で精製した PCR 産物 1.5 μl、3.2 pmol のプライマー (5'-ATGCCAACCATCCAGCAGCT-3')、5 倍濃度の Terminator Ammonium Cycle Sequencing

buffer 4 $\mu$ l, dNTP 1 $\mu$ l, 4種の塩基に蛍光標識した dideoxynucleotide dyedeoxy terminator 1 $\mu$ l, 4U の *Taq* polymerase を混合し, mineral oil を1滴重層して, cycle sequencing 反応を25サイクル (denaturation が96 $^{\circ}$ C30秒, annealing が50 $^{\circ}$ C15秒, extension が60 $^{\circ}$ C4分) 行った。得られた PCR 産物に70% エタノールを74 $\mu$ l 加えて氷中に30分間静置した後, 室温にて14000rpm で20分間遠心し, 上清を捨てたあと沈渣を5分間空気乾燥させた。その後 loading buffer (deionized formamide と, blue dextran 50mg/ml を含有した25mM EDTA 溶液の5:1 混合液) 6 $\mu$ l を加えて, 90 $^{\circ}$ C で2分間加温したあと氷上に静置した。この溶液2.5 $\mu$ l を用いて ABI PRISM 377 DNA Sequencer の4% acrylamide gel 内電気泳動を行い, 指定のマニュアルに従って塩基配列のデータを解析した。

3) 制限酵素を用いた変異の検出

前記の PCR-direct sequencing 法で得られた塩基配列のデータをもとに, 変異のみられた部位の塩基配列を特異的に認識して切断する制限酵素, *Mbo* II を使用して, 変異の迅速検出法の有用性を検討した。4. で得られた PCR 産物 1 $\mu$ g を新しいマイクロチューブに移し, *Mbo* II 10 units, 反応液 5 $\mu$ l (10mM Tris HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, pH7.5), DDW 24 $\mu$ l を加えて合計 50 $\mu$ l とし, 37 $^{\circ}$ C にて1時間加温して DNA を切断した。その後, 3% アガロースゲル (Nusieve 3:1 agarose, FMC BioProducts) にて電気泳動を行い, EB 染色にて DNA の切断の有無を確認し, コントロールの H37Rv と比較した。

結果

今回検討した結核菌41株は, 当科および関連施設においてすべて生化学的に結核菌と同定されたものであったが, 確認のために行った *Pab* 遺伝子および *rpsL* 遺伝子に対する PCR もすべて陽性であったことから, 全株結核菌として以下の検討を行った。

41株の SM 感受性成績と3種類の *rpsL* 遺伝子の変異検出法の結果を図1に示した。液体培地での SM 耐性基準を Siddiqi ら<sup>17)</sup> に従って 10 $\mu$ g/ml 以上とすると, SM 耐性菌は41株中18株 (43.9%) であった。

PCR-SSCP 法による *rpsL* 遺伝子内の変異の有無の検討 (図2) では, 41株中9株にコントロールと異なるバンドがみられ, これらの株に対する SM の MIC はいずれも 256 $\mu$ g/ml 以上であった。PCR-SSCP 法で検出された耐性菌の頻度は全耐性菌の50% (9/18) であった。

一方, *rpsL* 遺伝子の PCR-direct sequencing の結果 (図3), 41株中11株に point mutation が検出され, その変異はすべて Lys-43 (AAG) が Arg-43 (AGG) に変わった点変異であることが確認された。また, codon 88には変異は全くみられなかった。この11株に対する SM の MIC はすべて 256 $\mu$ g/ml 以上で, 変異の検出率は全耐性菌の61.1% (11/18) であった。

また, 上記の点変異がすべて同一部位の同一内容の変異であったことから, この変異部位を特異的に認識して DNA を切断する制限酵素, *Mbo* II を使用し, 点変異の有無が酵素切断により簡便かつ迅速に検出可能かどうかを検討した。その結果, 標準株 H37Rv および変異の

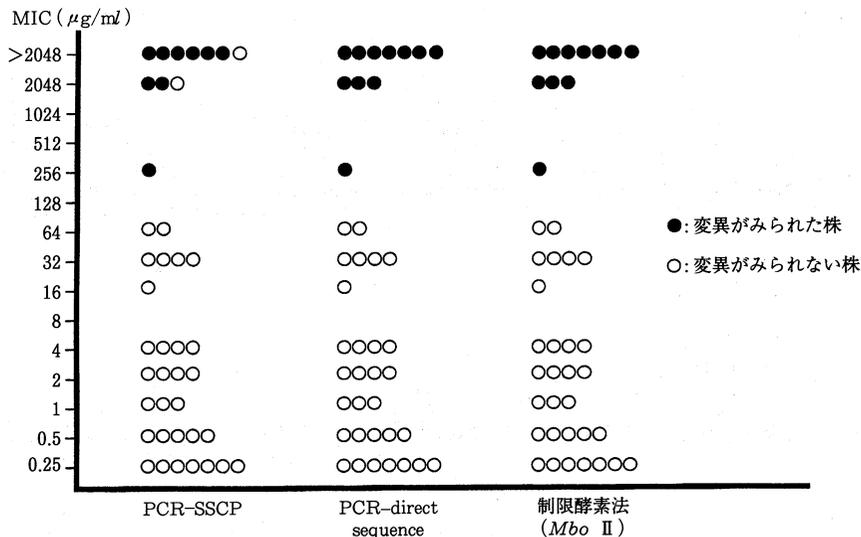


図1 SMのMIC分布と3種類の変異検出法の比較

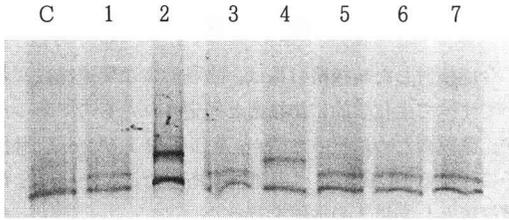


図2 PCR-SSCP法による検出例

C: コントロール (H37Rv), 1: SMのMICが0.25  $\mu\text{g/ml}$  の菌, 以下同様に, 2: 256  $\mu\text{g/ml}$ , 3: 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , 4: 2048  $\mu\text{g/ml}$ , 5: 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 6: 1  $\mu\text{g/ml}$ , 7: 2  $\mu\text{g/ml}$ . 1, 3, 5, 6, 7はコントロールと同じ泳動度を示したSM感受性菌, 2, 4は泳動度が異なるSM耐性菌。

ない臨床分離株では, 36bpのPCR産物がMbo IIにより138bpと222bpに切断されたのに対し, 点変異がみられた11株では全株切断されなかった(図4)。したがって変異の検出率はPCR-direct sequencing法と同じく61.1% (11/18)であった。

### 考 案

近年, 欧米ではAIDS患者やホームレスの増加とともに, 薬剤耐性結核菌感染症の蔓延が報告されている<sup>18)</sup>。Concatoらによると, ホームレスの結核患者では1剤のみ耐性の頻度が14%, 多剤耐性が16%で, 明らかに耐性菌感染の頻度が高いことを示し, その原因は治療失敗

例が約半数にみられたためとしている<sup>19)</sup>。SMに対する耐性結核菌の分離頻度は約20~30%を上限として各国でさまざまな報告がみられる<sup>20)~24)</sup>。わが国では幸い1977年から92年にかけて約6%の頻度で推移し, SM耐性菌の増加はみられていない<sup>25)</sup>。しかし, SMは結核症に対する標準的な治療薬であるとともに, ethambutolの代わりに使用する症例も多いことから, SMに対する原因菌の感受性を分子生物学的に迅速に予測することは, 治療薬の選択に際して意義があると思われる。

今回私たちは臨床分離結核菌のSM感受性と耐性遺伝子変異との関係を明確にし, 各種変異検出法の有用性を検討した。その結果, まず第1にMICが256  $\mu\text{g/ml}$ 以上のSM高度耐性菌では*rpsL*遺伝子内点変異が全株にみられ, しかもその変異の部位と種類はすべて同一であった(Lys-43からArg-43へのアミノ酸変異)。SM耐性菌に占める*rpsL*遺伝子内変異の頻度は, Heymらは52%<sup>26)</sup>, Morrisらは57%<sup>27)</sup>, Sreevatsanらは54%<sup>28)</sup>と報告しており, 私たちの61%もこれらと類似した成績であった。

また, アミノ酸変異の種類も他の報告<sup>27)~29)</sup>と同様に, すべてがLysからArgへの変化であった。これらの結果より, わが国における結核菌のSM耐性化の分子生物学的メカニズムも, 欧米諸国と類似していることが推測できた。しかし, 同じ*rpsL*遺伝子内のcodon 88の変異が, 今回の私たちの検討株では全く認められなかったことは他の報告<sup>28)</sup>と矛盾する点でもある。この現象

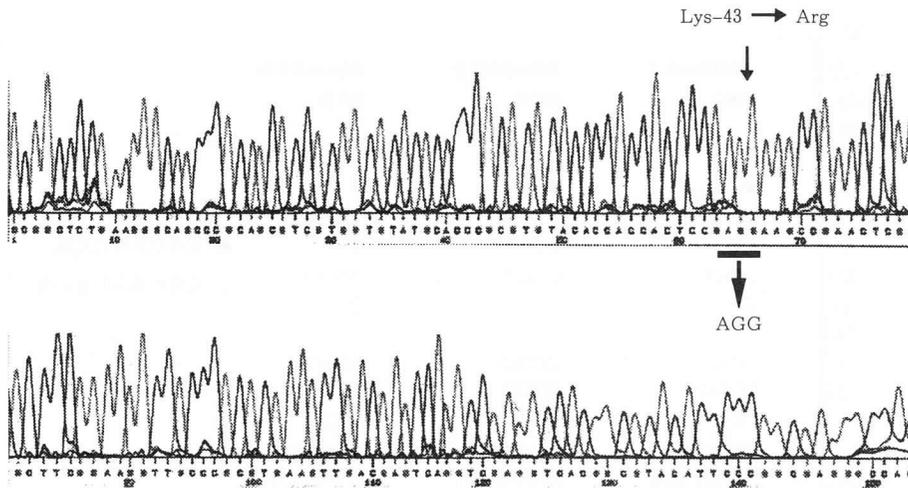


図3 PCR-direct sequencing法による検出例

MICが2048  $\mu\text{g/ml}$ のSM耐性菌で, Lys-43からArgへのアミノ酸変異がみられた。

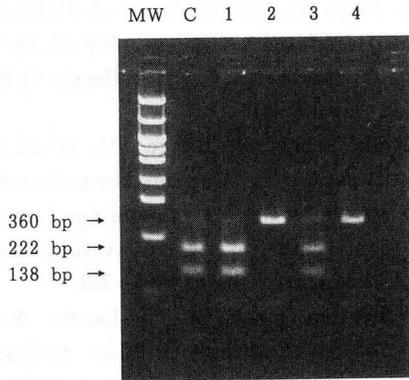


図4 制限酵素法による検出例

C: コントロール (H37Rv), 1: SM の MIC が  $0.25 \mu\text{g/ml}$  の菌, 以下同様に, 2:  $256 \mu\text{g/ml}$ , 3:  $0.25 \mu\text{g/ml}$ , 4:  $2048 \mu\text{g/ml}$ . 1 と 3 では切断され, 2 と 4 は切断されていない。

が国レベルの地域差によるものなのか, あるいは日本国内レベルでの差によるものなのか, 今後, 株数を増やして検討する必要がある。

第2に, SM 耐性菌に対する各検査法の変異検出率は, PCR-SSCP 法が50%, PCR-direct sequencing 法と制限酵素法がいずれも61%であった。これらの結果より, PCR-direct sequencing 法が最も確実な変異の検出法ではあるものの, MIC  $256 \mu\text{g/ml}$  以上の SM 耐性結核菌のみに限れば, 検査の費用や迅速性の面からは制限酵素法がより安価で簡便であることが示唆された。一方, PCR-SSCP 法に関しては, 手技そのものは比較的容易ではあるものの, 2株で変異が確認できず, Heymら<sup>26)</sup>も指摘しているように, 検出感度にやや難点がみられた。また, 同法では変異の種類が判別できないことなどから, 今後さらに特異性と感度を高めた新しい方法の開発が必要であろう。

SM 耐性関連遺伝子は *rpsL* 遺伝子のみでなく, 16S rRNA をコードする遺伝子 (*rrs*) も報告されている<sup>16) 30)</sup>。また, 低濃度 SM 耐性 (MIC が  $10 \mu\text{g/ml}$  以上) と高濃度 SM 耐性 (MIC が  $160 \mu\text{g/ml}$  以上) では関与する遺伝子が異なるとの報告もみられる<sup>29) 31)</sup>。今回の私たちの検討は *rpsL* 遺伝子のみであるが, *rrs* 遺伝子も約10%の頻度で変異がみられることから<sup>26) 27)</sup>, この遺伝子についても同様の検討を行えば, より正確で迅速な SM 耐性の推定が可能になるものと思われる。今後さらに供試菌株を増やすとともに, 分離培養菌からのみでなく, 臨床検体から直接 SM 耐性遺伝子を検索する方法も検討する予定である。

## まとめ

SM 耐性結核菌における *rpsL* 遺伝子内変異について検討し, 以下の知見を得た。

(1) PCR-SSCP 法による *rpsL* 遺伝子内の変異の検出の結果, 18株中9株 (50%) に変異がみられ, SM の MIC は9株すべて  $256 \mu\text{g/ml}$  以上であった。

(2) PCR-direct sequence 法による *rpsL* 遺伝子内の変異の検出の結果では, 18株中11株 (61%) に point mutation が検出され, そのアミノ酸変異はすべて Lys-43 から Arg-43 への点変異であり, SM の MIC はすべて  $256 \mu\text{g/ml}$  以上であった。

(3) 制限酵素法 (*Mbo* II) による *rpsL* 遺伝子内の変異の検出の結果では, 18株中11株 (61%) で酵素による切断がみられず, 酵素認識部位の point mutation が予測された。また, これらの株はすべて PCR-direct sequence 法にて point mutation が検出された株と一致した。

以上より PCR 法を用いたストレプトマイシン耐性結核菌の迅速な検出が可能であることが示唆された。

## 文 献

- 1) Miyazaki Y, Koga H, Kohno S, et al.: Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microb.* 1992; 31: 2228-2232.
- 2) Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microb.* 1993; 31: 3270-3274.
- 3) Bercovier H, Resnick M, Kornitzer D, et al.: Rapid method for testing drug-susceptibility of *Mycobacterium* spp. and gram-positive bacteria using rhodamine 123 and fluorescein diacetate. *J Microbiol Methods.* 1987; 7: 139-142.
- 4) Lee C, Heifets LB: Determination of minimal concentrations of antituberculosis drugs by radiometric and conventional methods. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136: 349-352.
- 5) Nilsson LE, Hoffner SE, Ansehn S: Rapid susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32: 1208-1212.

- 6) Kawa DE, Pennell DR, Kubista LN, et al. : Development of a rapid method for determining the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid using the Gen-Probe DNA Hybridization System. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 ; 33 : 1000-1005.
- 7) Cooksey RC, Crawford JT, Jacobs WR Jr, et al. : A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 1348-1352.
- 8) Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, et al. : Rapid assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science.* 1993 ; 260 : 819-822.
- 9) Vliet GME, Schepers P, Schukkink RAF, et al. : Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 ; 38 : 1959-1965.
- 10) Miyamoto J, Koga H, Kohno S, et al. : New drug susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* using the hybridization protection assay. *J Clin Microb.* 1996 ; 34 : 1323-1326.
- 11) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. : The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* 1992 ; 358 : 591-593.
- 12) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. : *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 1994 ; 263 : 227-230.
- 13) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. : Direct, automated detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 2054-2058.
- 14) Ohno H, Koga H, Kohno S, et al. : Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 ; 40 : 1053-1056.
- 15) Ohno H, Koga H, Kuroita T, et al. : Rapid prediction of rifampin-susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* (in press)
- 16) Meier A, Kirschner P, Bange FC, et al. : Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 ; 38 : 228-233.
- 17) Siddiqi SH, Hawkins JE and Laszlo A : Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radio-metric procedure and two conventional methods. *J Clin Microb.* 1985 ; 22 : 919-923.
- 18) Haas DW, Des Prez RM : Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome : a historical perspective on recent developments. *Am J Med.* 1994 ; 96 : 439-450.
- 19) Concato J, Rom WN : Endemic tuberculosis among homeless men in New York City. *Arch Intern Med.* 1994 ; 154 : 2069-2073.
- 20) Steiner P, Rao M, Victoria MS, et al. : A continuing study of primary drug-resistant tuberculosis among children observed at the Kings County Hospital Medical Center between the years 1961 and 1980. *Am Rev Respir Dis.* 1983 ; 128 : 425-428.
- 21) Hoffner SE, Kallenius G : Susceptibility of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains to amikacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1988 ; 7 : 188-190.
- 22) Jarallah JS, Elias AK, Al Hajjaj MS, et al. : High rate of rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in the Taif region of Saudi Arabia. *Tuberclu Lung Dis.* 1992 ; 73 : 113-115.
- 23) Braun MM, Kilburn JO, Smithwick RW, et al. : HIV infection and primary resistance to antituberculosis drugs in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS.* 1992 ; 6 : 1327-1330.
- 24) Tahaoglu K, Kizkin O, Karagoz T, et al. : High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey. *Tuberclu Lung Dis.* 1994 ; 75 : 324-328.
- 25) 結核療法研究協議会 : 入院時薬剤耐性に関する研究 (その1) - 1992年の調査成績一. 平成6年度療研研究報告書. 1994 : 5-9.

- 26) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al. : Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* 1994; 344: 293-298.
- 27) Morris S, Bai GH, Suffys P, et al. : Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1995; 171: 954-960.
- 28) Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE et al. : Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1024-1026.
- 29) Meier A, Sander P, Schaper KJ, et al. : Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2452-2454.
- 30) Honore N, Marchal G, Cole ST: Novel mutation in 16S rRNA associated with streptomycin dependence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 769-770.
- 31) Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, et al. : Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1186-1188.