คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อวัณโรค ที่ต้านยา ciprofloxacin

นางสาวจุฑาอัจฉร์ อุณหสูต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-007-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19902624

GENETIC CHARACTERIZATION OF CIPROFLOXACIN RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

MISS CHUDAACHHARA UNHASUTA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology
Inter- Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-332-007-5

Thesis Title	Genetic characterization of ciprofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*
By	Miss Chudaachhara Unhasuta
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Nibondh Udomsantisuk, M. Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

----------Dean of the Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis committee:

----------Chairman

(Anan Chongthaleong, M.D.)

----------Thesis Advisor

(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

----------Thesis Co-Advisor

(Nibondh Udomsantisuk, M. Sc.)

----------Member

(Charoen Chuchottaworn, M.D.)

----------Member

(Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จุฑาอัจฉร์ อุณหสูต : คุณลักษณะทางพันธุ์ศาสตร์ของเชื้อวัณโรคที่ต้านยา ciprofloxacin. อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมหญิง ธัมวาสร , อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ นิพนธ์ อุดมสันติสุข. 70 หน้า ISBN 974-332-007-5

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ในยีน *gyr* A กับการดื้อยา ciprofloxacin ในเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ได้นำเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* จำนวน 21 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบโดยวิธี absolute concentration แล้วพบว่าเชื้อดื้อต่อยา ofloxacin และเชื้อที่มีความไวรับต่อยาจำนวน 20 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยา ciprofloxacin โดยวิธี radiometric method (BACTEC) พบว่าเชื้อที่ดื้อยาทั้ง 21 สายพันธุ์ ดื้อต่อยา ciprofloxacin หลังจากนั้น นำแต่ละสายพันธุ์มาทำการเพิ่มปริมาณ DNA แล้วตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธี DNA sequencing และ heteroduplex formation (HDF) วิธี DNA sequencing สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์คิดเป็น 85.71% โดยพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งเบสที่ 94 โดย 6 สายพันธุ์ เปลี่ยนแปลงจาก กรดอะมิโน Aspartic เป็น Asparagine, 7 สายพันธุ์ เปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน Aspartic เป็น Alanine, 4 สายพันธุ์ เปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน Aspartic เป็น Glycine, 1 สายพันธุ์ เปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน Aspartic เป็น Tyrosine และอีก 14.29% ไม่พบการกลายพันธุ์ เชื้อที่ไวรับต่อยา 20 สายพันธุ์ ไม่พบการกลายพันธุ์ ส่วนการประเมินค่าวิธี HDF เพื่อจะใช้เป็นวิธีตรวจสอบที่รวดเร็วสำหรับตรวจหาเชื้อที่มีการกลายพันธุ์นั้นพบว่าวิธีนี้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ในยีนและเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ในยีนได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์..
สาขาวิชา .....จุลชีววิทยาทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา .....2541.....

ลายมือชื่อนิสิต .....จุฑาอัจฉร์ อุณหสูต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวแผ่นเดียว

C845589 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: *M. tuberculosis* /DNA SEQUENCING / HETERODUPLEX FORMATION / FLUOROQUINOLONE / CIPROFLOXACIN.
CHUDAACHHARA UNHASUTA : GENETIC CHARACTERIZATION OF CIPROFLOXACIN RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.* THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR SOMYING TUMWASORN, Ph.D., CO-ADVISOR : NIBONDH UDOMSANTISUK, M. Sc. 70 pp. ISBN 974-332-007-5.

To find the association of *gyr*A gene mutation with ciprofloxacin-resistance in *M. tuberculosis*, 21 clinical isolates of ofloxacin-resistant *M. tuberculosis*, determined by absolute concentration method, and 20 ciprofloxacin-susceptible clinical isolates were also included in this study. Resistant clinical isolates selected on media containing ciprofloxacin were tested for ciprofloxacin and ofloxacin susceptibility testing by radiometric method (BACTEC). The results compared well with the absolute concentration method as all isolates were resistant to ciprofloxacin. For the genetic information, *gyr*A gene of each isolate was amplified and was determined mutation by DNA sequencing and heteroduplex formation analysis. DNA sequencing could detect the *gyr*A mutation in 18 isolates; Asp→Asn (n=6), Asp→Ala (n=7), Asp→Gly (n=4), Asp →Tyr (n=1) and the 3 isolates lacked mutation. No mutation was found in 20 ciprofloxacin-susceptible clinical isolates. Evaluation of polymerase chain reaction-heteroduplex formation (PCR-HDF) analysis for rapid susceptibility testing revealed that this technique could not detect the differentiation between susceptible strain H37Rv and resistant strain.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible :

Associate Professor Dr. Somying Tumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her kindness and indispensable help in supervising this thesis.

Instructor Nibondh Udomsantisuk, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for his valuable advice and assistance.

Anan Chongthaleong, M.D., the chairman of thesis committee, Department of Microbiology , Faculty of Medicine , Chulalongkorn University , and Associate Professor Somjai Reingprayoon, M.D. and Charoen Chuchottaworn, M.D., the member of thesis committee for their constructive criticisms.

Graduate school and Research Affairs, Chulalongkorn University, for research assistant grant.

Sincere thanks go to the staffs of the Department of Microbiology and the fellow students for providing facilities and encouragement. Finally, I am deeply indebted to my parents and sisters for their love, concern, help encouragement and understanding.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT(ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....ix

ABBREVIATIONS.....x

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

II. OBJECTIVES.....7

III. LITERATURE REVIEW.....8

IV. MATERIALS AND METHODS.....26

V. RESULTS.....37

VI. DISCUSSION.....47

VII. CONCLUSIONS.....50

REFERENCES.....51

APPENDIX I.....65

APPENDIX II.....67

LIST OF TABLE

Table Page

1 : Gene loci involved in conferring drug-resistance in *M. tuberculosis*.....10

2 : The results of detection of *gyrA* gene mutation in reference strain and clinical isolates.....45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1 : Gyrase action.....9

2 : Single-amino acid substitution in *gyr*A gene.....11

3 : a. Dideoxynucleotide and Sanger sequencing principle.....18

b. Sanger sequencing method.....19

4 : Nucleotide sequence of the *gyr*A FQ resistance region amplified with primer GyrA1 and GyrA2.....38

5 : Agarose gel electrophoresis of amplified product compared with ϕx174 marker.....39

6 : The sequence gel autoradiography showed the differentiation sequence between susceptible strain and resistant strain at the position 94 (GAC→AAC).....40

7 : The sequence gel autoradiography showed the differentiation sequence between susceptible strain and resistant strain at the position 94 (GAC→GGC).....41

8 : The chromatogram obtained from automated sequencing showed the differentiation sequence between susceptible strain and resistant strain at the position 94 (GAC→GCC)...42

9 : The chromatogram obtained from automated sequencing showed the differentiation sequence between susceptible strain and resistant strain at the position 94 (GAC→AAC)...43

10 : The chromatogram obtained from automated sequencing showed the differentiation sequence between susceptible strain and resistant strain at the position 94 (GAC→TAC)...44

11 : Polyacrylamide gel electrophoresis for HDF analysis.....46

ABBREVIATIONS

Ala	Alanine
APS	Ammonium persulfate
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspatic acid
bp	base pair
°C	degree celsius
Cys	Cystidine
dATP	deoxyadenosine 5′-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5′-triphosphate
dGTP	deoxyguanosine 5′-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5′-triphosphate
ddATP	dideoxyadenosine 5′-triphosphate
ddCTP	dideoxycytidine 5′-triphosphate
ddGTP	dideoxyguanosine 5′-triphosphate
ddTTP	dideoxythymidine 5′-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
DDW	Deionized Distilled Water
DNA	deoxyribonucleic acid
DW	Distilled Water
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FQ	Fluoroquinolone
GI	Growth Index

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gly	Glycine
Gyr	Gyrase enzyme
gyr	Gyrase gene
h	hour
HDF	Heteroduplex Formation
His	Histidine
HMA	Heteroduplex Mobility Assay
HPA	Hybridization Protection Assay
LJ	Lowen-Stein Jensen
MDRTB	Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
n	number
OADC	Oleic Acid-Dextrose-Citrate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-SSCP	Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism
PCR-HDF	Polymerase Chain Reaction Heteroduplex Formation
Pro	Proline
PK	Proteinase K
QRDR	Quinolone-Resistant-Determining Region
RLU	Relative light Unit
rpm	round per minute
Ser	Serine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TBE	Tris-borate-EDTA
TEMED	N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
Tyr	Tyrosine
UV	Ultra Violet
V	Volt
Val	Valine
WHO	World Health Organization
μg	microgram
μl	microlitre
Δ	delta

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย