دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۶، صفحه ۱۱۵۹– ۱۱۵۳ (بهمن و اسفند ۱۳۹۳)

ISMJ 2015;17(6): 1153-1159

بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن ethA در سویه‌های حساس و مقاوم به اتیونامید در باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

سمیه معظمی [۱]، محمد ارجمندزادگان [۲*]، اعظم احمدی [۳]، مریم طیبون [۱]، مانا شجاع‌پور [۴]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
[۲] مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
[۳] مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
[۴] مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

(دریافت مقاله: ۹۲/۲/۸- پذیرش مقاله: ۹۲/۶/۱۲)

چکیده

زمینه: اتیونامید (ETH) یک آنالوگ ساختاری از ایزونیازید و از داروهای خط دوم در درمان بیماری سل می‌باشد. اتیونامید و ایزونیازید پروتئین INHA را در باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) هدف قرار می‌دهند. این پروتئین در بیوسنتز اسیدمایکولیک دیواره نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی ترادف ژن ethA به‌منظور شناسایی موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به اتیونامید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی در ۲۷ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم و حساس به اتیونامید مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به طویل بودن قطعه (۱۴۷۰ bp) جهت تعیین ترادف کامل ژن، از مجموعه پرایمرهای اختصاصی ethA-۱۰، ethA-۸، ethA-۹، ethA-۴، ethA-۵، ethA- ۱برای تولید سه قطعه‌ای که همپوشانی دارند در واکنش PCR، استفاده شد. به ازای هر نمونه سه واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ethA-۱۰، ethA-۸، ethA-۹، ethA-۴، ethA-۵، ethA- ۱ اجرا شد.

یافته‌ها: از ۲۷ سویه مورد بررسی، ۲۳ سویه مقاوم به اتیونامید و ۴ سویه حساس به دارو بودند. نتایج الکتروفورز نشان دهنده‌ی انتخاب مناسب پرایمرها و برنامه PCR بود. نتایج تعیین توالی، رخداد موتاسیون را در نقاط مختلف ژن، در سویه‌های مقاوم مورد مطالعه اثبات کرد. سویه‌های حساس نیز همگی فاقد موتاسیون بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که هرگونه جهش در هر نقطه از ژن ethA میتواند منجر به مقاومت به اتیونامید شود. تشخیص مولکولی سریع مقاومت از طریق توالی یابی کل ژن امکان پذیر است.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مقاومت دارویی، اتیونامید، تعیین توالی

* اراک، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
Email : arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

مقدمه

سل یک بیماری مسری است و بیماران مبتلا به سل ریوی مهم‌ترین منبع عفونت هستند. این افراد در هنگام سرفه سبب ایجاد ذرات کوچک عفونی می‌شوند که حاوی باسیل‌های سل است و تنفس آن‌ها مهم‌ترین راه ابتلا و گسترش بیماری سل است (۱ و ۲).

در سال‌های اخیر، بروز و گسترش سل مقاوم به دارو نگرانی‌های زیادی در برنامه‌ی جهانی کنترل سل ایجاد کرده است. شکست برخی از برنامه‌های کنترل سل به این دلیل است که فقط یک سوم یا نیمی از موارد اسمیر مثبت بیماری تشخیص داده می‌شوند (۳). پیشرفت در تشخیص و درمان بیماری، کلید کنترل مؤثر بیماری سل می‌باشد، در نتیجه لازم است که ژنتیک و فیزیولوژی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و نحوه غلبه باکتری‌ها بر سیستم دفاعی میزبان و ایجاد بیماری، مورد مطالعه دقیق قرار گیرد (۴ و ۵).

درمان سه دارویی، اساس درمان سل می‌باشد. اتیونامید یکی از داروهای رده دوم در درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد که در درمان سل مقاوم به دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد و یک آنالوگ ساختاری از ایزونیازید است (۶). اتیونامید یک پیش داروست که توسط یک آنزیم منواکسیژناز (RV۳۸۵۴C) به نام EtaA یا EthA فعال می‌شود و سپس پروتئین inhA درگیر در سنتز مایکولیک اسید را مهار می‌کند (۷). ژن ethA آنزیم فلاوین منواکسیژناز را کد می‌کند، این آنزیم در جایگاه فعال خود حاوی گروه فلاوپروتئینی (FAD) می‌باشد که توسط این گروه واکنش‌های آنزیمی خود را کاتالیز می‌کند. از جمله این واکنش‌ها تبدیل داروی اتیونامید به آنالوگ‌هایی از جمله S-oxid می‌باشد، این آنالوگ‌ها روی دیواره سلولی باکتری اثر می‌گذارند و با جلوگیری از سنتز اسیدهای مایکولیک و با ایجاد واکنش‌های اکسید و احیا منجر به مرگ سلول می‌شوند (۸).

در سویه‌های مقاوم به اتیونامید هرگونه موتاسیون در ژن ethA باعث عدم تولید آنزیم فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) شده و در نتیجه اتیونامید فعال نشده و باکتری نمی‌میرد. بیان ژن ethA تحت کنترل تنظیمی منفی پروتئین رپرسور EthR می‌باشد. افزایش در بیان EthR میزان فعالیت ژن ethA را کاهش می‌دهد. در نتیجه منجر به کاهش فعالیت دارو و افزایش مقاومت به اتیونامید می‌شود (۹).

تعیین رخداد جهش که می‌تواند جایگزین روش بسیار وقت‌گیر کشت باشد، از اولویت‌های اصلی در علم مایکوباکتریولوژی محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه ارائه روشی کاربردی برای شناسایی موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به اتیونامید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

مواد و روش‌ها

۲۷ نمونه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بانک DNA مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی اراک بر اساس نتایج تست تعیین مقاومت داروئی انتخاب گردید.

PCR

با توجه به طول بسیار بلند ژن ethA (bp۱۴۷۰) به‌منظور تکثیر، توالی این ژن با کمک پرایمرهای طرحی شده به سه قسمت تقسیم گردید. به همین دلیل سه جفت پرایمر مورد استفاده قرار گرفت.

پرایمرهای ethA ۱-F و ethA۱-R یک قطعه bp۶۶۷ به نام ETH۱، پرایمرهای ethA ۲-F و ethA۲-R یک قطعه bp۶۹۲ به نام ethA۲ و پرایمرهای

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

ethA۳-F و ethA۳-R یک قطعه bp۳۴۲ به‌نام ethA۳ را تکثیر می‌کنند. این سه قطعه تولید شده در برخی ترادف‌ها با هم دیگر هم‌پوشانی دارند (۹). واکنش PCR در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر مطابق جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱) حجم و غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR

ردیف	نام ماده	غلظت	حجم (میکرولیتر)
۱	DNA	۴۰ng	۲
۲	Buffer	۱۰X	۲/۵
۳	MgCL2	۵۰mM	۰/۵
۴	dNTPs	۱۰ mM	۱
۵	Primer F	۱۰pmol	۲
۶	Primer R	۱۰pmol	۲
۷	taq	۱unit	۰/۵
۸	H2O		Up to ۲۵

دمای اتصال پرایمرها در واکنش PCR بر مبنای دمای ذوب آن‌ها تعیین می‌شود. پرایمرهای قطعات ۱ و ۲ دمای اتصال و Tm مشابهی داشتند به این لحاظ از یک برنامه برای هر دو استفاده شد اما برای تکثیر قطعه ۳ به‌دلیل اختلاف در دمای اتصال، از برنامه PCR متفاوتی استفاده شد.

سیکل حرارتی برای تکثیر قطعات (eth۱) و (eth۲) از ژن ethA شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل به‌صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه،۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه استفاده گردید.

سیکل حرارتی برای PCR ژن ethA برای قطعه‌ی (eth۳) نیز به این ترتیب بود: دناتوراسیون اولیه ۹۵°C به‌مدت ۴ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل دناتوراسیون ۹۵°C به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها ۶۸°C به‌مدت ۱ دقیقه، تکثیر۷۲°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر نهائی۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. جدول ۲ توالی پرایمرهای استفاده شده برای انجام PCR و تعیین توالی را نشان می‌دهد.

جدول ۲) توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر ژن ethA

نام پرایمر	ترادف (۳-۵)	اندازه محصول PCR
ethA1-F	ATC ATC GTC GTC TGA CTA TGG	۶۶۷bp
ethA1-R	ACT ACA ACC CCT GGG ACC	
ethA2-F	CCT CGA CCT TCC CGT GA	۶۹۲bp
ethA2-R	CCT CGA GTA CGT CAA GAG CAC	
ethA3-F	GGT GGA ACC GGA TAT GCC TG	۳۴۲bp
ethA3-R	CGT TGA CGG CCT CGA CAT TAC	

الکتروفورز

بررسی وجود قطعات تکثیر شده با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت و نتیجه با کمک دستگاه ترانس لومیناتور بررسی گردید.

تعیین توالی (Sequencing)

محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Source BioScience انگلستان ارسال گردیده و با کمک دو پرایمر رفت و برگشت با دستگاه Applied Biosystem تعیین توالی شدند. سپس نتیجه تعیین توالی با کمک نرم‌افزار Mega4 و Chromas بررسی گردید.

یافته‌ها

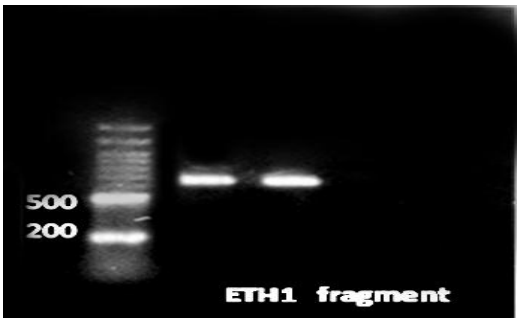
سویه‌های مورد بررسی

در این تحقیق جمعاً از ۲۷ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شد. که از این تعداد ۲۳ نمونه (۸۵/۲ درصد) مقاوم به اتیونامید و ۴ نمونه (۱۴/۸ درصد) حساس به اتیونامید بودند (جدول ۳).

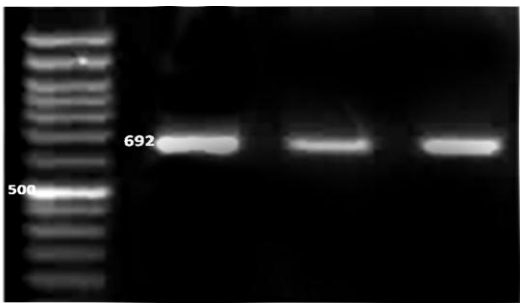
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

نتایج PCR

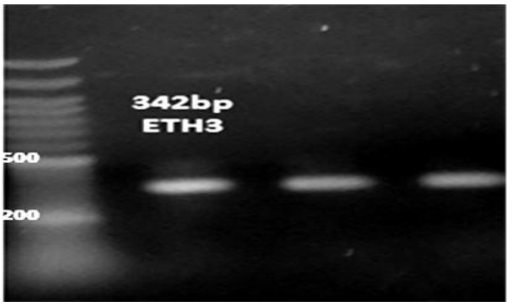
محصولات PCR ۲۷ نمونه مورد مطالعه که با استفاده از پرایمرهای ژن ethA تکثیر شده بودند، روی ژل الکترفورز باندهای مطلوب ایجاد کردند که نشانگر صحت انتخاب پرایمرها و تعیین برنامه مناسب PCR بود (اشکال ۱ –۳). در شکل‌های ۱، ۲ و ۳، ۳ قطعه ۶۶۷bp، ۶۹۲bp، ۳۴۲bp که با پرایمرهای به‌ترتیب ethA۱ و ethA۲ و ethA۳ تولید شده اند، قابل مشاهده می‌باشند.



شکل ۱) محصول حاصل از تکثیر قطعه ethA۱: ستون سمت چپ مارکر و سایر ستون‌ها محصول ۶۶۷ جفت بازی ethA۱ را نشان می‌دهند



شکل ۲) محصول حاصل از تکثیر قطعه‌ی ethA۲: ستون سمت چپ مارکر و سایر ستون‌ها محصول ۶۹۲ جفت بازی ethA۲ را نشان می‌دهند



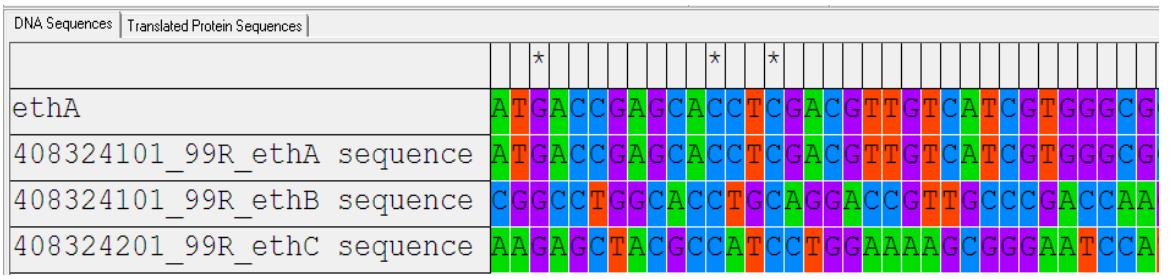
شکل ۳) محصول حاصل از تکثیر قطعه‌ی ethA۳: ستون سمت چپ مارکر و سایر ستون‌ها محصول ۳۴۲ جفت بازی ethA۳ را نشان می‌دهند

نتایج تعیین توالی

نتایج تعیین توالی برای هر نمونه شامل توالی سه قطعه بود که با کمک برنامه Mega4 هم‌پوشان شدند. سپس توالی به‌دست آمده با توالی استاندارد ژن، با استفاده از Blast-NCBI در برنامه Mega4 با یکدیگر منطبق شدند (شکل ۴).

رخداد موتاسیون در هر سویه با انطباق توالی استاندارد و توالی به‌دست آمده از سویه‌ها بررسی شد (شکل ۴). دقت در انطباق، توجه به احتمال رخداد خطا در تعیین توالی، استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت هم‌پوشان و تکرار آزمایش در صورت نیاز، دقت کار را افزایش داد.

شماره نوکلئوتیدهای به‌دست آمده حاصل از تفسیر نتایج برخی از نمونه‌های مورد بررسی را در جدول ۳ مشاهده می‌کنید. سویه‌های مقاوم به اتیونامید مانند سویه ۱۲۴x، ۹۹x و ۱۱۵x به‌ترتیب در نوکلئوتیدهای ۳۰۵، ۳۱۲ و ۶۲۸ دارای موتاسیون بودند. سویه ۱۹N نیز دارای موتاسیون در کدون ۳۳۱ بود.



شکل ۴) نتایج حاصل از توالی‌یابی نمونه ۹۹R بررسی شده با نرم‌افزار MEGA4

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

از طرف دیگر تمامی سویه‌های حساس به اتیونامید از جمله نمونه ۷۲۵ فاقد هرگونه موتاسیون بود. این مسئله انطباق کامل فنوتیپی و ژنوتیپی را نشان می‌دهد. سویه استاندارد H۳۷RV به‌عنوان کنترل منفی فاقد موتاسیون بود. ولی سویه‌های ۵۲۵، ۵۳۵ و ۷۲۵ از انواع بسیار مقاوم به سایر داروها ولی حساس به اتیونامید بودند. به‌طور کلی سویه‌های حساس به تمامی داروها و یا تنها حساس به اتیونامید فاقد هر گونه موتاسیون در این ژن بودند و درصد انطباق فنوتیپی و ژنوتیپی در آن‌ها ۱۰۰ درصد بود.

جدول ۳) نوکلئوتید تغییر یافته در برخی از نمونه‌های مورد بررسی. R، سویه مقاوم وS سویه حساس از نظر فنوتیپی را نشان می‌دهد

نام نمونه	فنوتیپ	نوکلئوتید تغییر یافته
۹۹R	R	۳۰۵
۱۲۴X	R	۳۱۲
۱۹N	R	۳۳۱
۱۱۵X	R	۶۲۸
۷۲۵	S	—

بحث

موتاسیون در ژن ethA با مقاومت به اتیونامید مرتبط است. در این پژوهش بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک اتیونامید در سویه‌های کلینیکی MTB مورد ارزیابی ملکولی گرفت. بدین‌منظور سویه‌های مقاوم و حساس به اتیونامید که تعیین مقاومت در آن‌ها به‌روش فنوتیپی کشت صورت پذیرفته است مورد استفاده قرار گرفته و از روش‌های PCR و تعیین توالی برای تعیین موتاسیون در این ژن استفاده به‌عمل آمد. از نظر میکروب‌شناسی، مقاومت دارویی به‌دلیل جهش ژنتیکی در ژنوم باسیل در حضور دارو اتفاق می‌افتد. درمان ناقص یا اشتباه اجازه می‌دهد که باسیل‌های جهش یافته‌ای که به داروها مقاوم شده‌اند به سوش غالب در بدن فرد مبتلا تبدیل شوند. به این ترتیب باسیل‌های حساس به دارو در اثر داروهای ضد سل مصرفی از بین می‌روند، اما موتانت‌های مقاوم در حضور آنتی‌بیوتیک، تکثیر یافته و به سوش غالب در بدن بیمار مبدل می‌شوند (۹ و ۱۲).

مورلاک (Morlock) در سال ۲۰۰۳ ژن ethA را در ۴۱ سویه مقاوم به اتیونامید تعیین توالی کرد. نتایج به‌دست آمده در مطالعه مذکور در ۱۵سویه، موتاسیون در ژن ethA را نشان داد که در تمامی آن‌ها MIC اتیونامید بیشتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بر اساس این نتایج، موتاسیون‌های ژن ethA کاملاً متنوع و در سراسر ژن پراکنده بودند (۹) این مسئله با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

در تحقیق مورلاک، موتاسیون در ethA و inhA با مقاومت سطح بالا به اتیونامید مرتبط بود. حدود ۷۶ درصد از سویه‌های مقاوم با MIC بیش از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مقاوم به اتیونامید موتاسیون داشتند. در ۸ سویه مقاوم، موتاسیون حذفی در ژن inhA کشف شد (۹). در تحقیق حاضر موتاسیون حذفی در سویه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.

بروزیر (Brossier) در سال ۲۰۰۹ نیز با استفاده از تعیین توالی ژن ethA، ۸۷ سویه را مورد بررسی قرار داد که از این تعداد ۴۷ نمونه مقاوم به اتیونامید و ۲۴ نمونه حساس و ۱۶ نمونه مقاومت نسبی داشتند. در ۸۱ درصد از سویه‌های مقاوم، موتاسیون‌هایی در ethA، ethR یا inhA یا پروموتر آن یافت شد. از ۱۶ سویه که مقاومت نسبی داشتند، در ۷ سویه یک موتاسیون در ethA و در ۸ سویه هیچ موتاسیونی کشف نشد و یکی از نمونه‌ها نیز موتاسیون در mshA داشت. از ۲۴ سویه حساس به اتیونامید در مطالعه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

بروزیر، در ۲۳ نمونه هیچ موتاسیونی در ژن ethA نشان داده نشد و در یکی از نمونه‌ها یک موتاسیون جدید در پروموتر inhA نشان داده شد (۱۰). نتایج این محقق، با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر رخداد یک و یا چند موتاسیون عامل مقاومت در سویه‌ها مطابقت دارد. سویه‌های کاملاً حساس و یا تنها حساس به اتیونامید نیز فاقد هرگونه موتاسیون در این ژن بودند.

بر اساس نتایج این تحقیق، رخداد هرگونه موتاسیون در هر نقطه از ژن باعث ایجاد مقاومت به اتیونامید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌گردد. بدین‌ترتیب انجام تعیین توالی و اثبات هر میزان موتاسیون، اثبات کننده مقاومت به اتیونامید در سویه‌ها می‌باشد.

References:

1.Nasr Esfahani B. Genetics and detection. In: Narimani T, editor. Tuberculosis, Managing, detection, treatment and drug resistance. 1th edition. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences, 2010, 75-102.
2.Donnelly R. Cardinal Manifestations and Presentation of Diseases. In: Loscalzo J, editor. Harrison principles of internal medicin. 14th edition. Wiley-vch verlag gmbh and co. kgaa, 1998, 300-17.
3.Jawetz E, levinson W. Sources of infection, In: Doerr B, Fleischer VAJ, Kemp F, editors. medical microbiology and immunology, Ottawa Health Research Institute, 2008, 121-3.
4.Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. Tuberculosis, Pulmonary. Tuberculosis From basic science to patient care. Amedeo Challenge, 2007, 234-255.
5.Nasehi M, Mirhaghani L. Mycobacterium Tuberculosis. National Tuberculosis Control Guide. Sanandaj: Andishmand Co, 2009, 12-14.
6.Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR, et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. Eur Respir J, 2009; 34: 1202-3.
7.Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: a review of colourimetric methods. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 754-62.
8.Vannelli TA, Dykman A, De Montellano PRO. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. J Biol Chem, 2002; 277: 12824-9.
9.Morlock GP, Metchock B, Sikes D, et al. ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3799-805
10.Brossier F, Veziris N, Aubry A, et al. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol 2010;48: 1683-9.
11.Shojaei H, Mycobacterium infectious. Guideline for Tuberculosis Conventional and Molecular Diagnosis, Isfahan: Isfahan university of medical sciences, 2011, 130-149.(Persian)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

ISMJ 2015; 17(6): 1153-1159

Original Article

Study of ethA gene sequence in Ethionamide resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

***S. Moazemi.*[1], *M. Arjomandzadegan* [2*], *A. Ahmadi* [3], *M. Tayebun* [1], *M. Shojapor* [4]**

[1] ***Microbiology Department, Faculty of Science, Islamic Azad University of Arak***
[2] ***Department of microbiology, Tuberculosis and Pediatric Infectious Disease Research Center , Arak University of Medical Sciences***
[3] ***Tuberculosis and Pediatric Infectious Disease Research Center, Arak, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran***
[4] ***Research Center of Molecular Medicine, University of Medical Sciences, Arak***

(Received 20 Apr, 2013 Accepted 3 Sep, 2013)

Abstract

Background: Ethionamide (ETH) is a structural analog of isoniazid and secondary line anti-tuberculosis drugs. Both of Ethionamide and isoniazid target INHA protein in mycobacterium tuberculosis. This protein involved in mycolic acid biosynthesis. The purpose of this study is evaluation of sequence of ethA gene in order to detect mutations related to resistance to isoniazide in clinical mycobacterium tuberculosis isolates.

Material and Methods: In this study were evaluated 27 resistance and sensitive isolates to ethionamide. Because of length of this fragment (1470bp) were performed three reactions for each sample with ethA-10, ethA-8, ethA-9, ethA-4, ethA-5 and ethA-1 specific primers in PCR reaction.

Results: From 27 used clinical isolates, 23 strains were resistant and 4 isolates were susceptible to ETH. Results of electrophoresis were proved proper selection of primers and PCR conditions. DNA sequencing results were determined mutations at some points of the gene in the resistant isolates to ETH, but none of susceptible strains harbored mutations.

Conclusion: According to the results it was proved that any mutations in each point of ethA gene could cause resistance to Ethionamid. Rapid molecular detection of the resistance is possible only via complete sequencing of total length of this gene.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug resistant, Ethionamide, sequencing

Address for correspondence*: Department of microbiology, Tuberculosis and Pediatric Infectious Disease Research Center, Arak University of Medical Sciences. Email: **arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]